

転写因子 SOG1 が制御する植物の DNA 損傷応答に関する研究

萩田 伸夫

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物成長制御研究室
(梅田 正明 教授)

平成 30 年 3 月 11 日 提出

目次

略語一覧 3
緒言 5
<hr/>	
第1章 SOG1 の標的遺伝子に関する解析	
1-1. 序論 16
1-2. 材料と方法 19
1-3. 結果 27
1-4. 考察 67
<hr/>	
第2章 ANAC044 および ANAC085 の DNA 損傷応答における役割	
2-1. 序論 78
2-2. 材料と方法 81
2-3. 結果 86
2-4. 考察 108
結言 114
謝辞 115
参考文献 116

略語一覽

Act-MYB	activator-type R1R2R3-Myb transcription factor
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
CDK	Cyclin-dependent kinase
<i>C. higginsianum</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>
ChIP	chromatin immunoprecipitation (ChIP-Seq: ChIP-sequence)
Col-0	Columbia ecotype
ETI	effector-triggered immunity
FC	fold change
fLUC	<i>firefly</i> luciferase
GO	gene ontology
GUS	β -glucuronidase
H2AX	H2A histone family, member X (γ -H2AX: H2AX, phosphorylated on serine 139)
HU	hydroxyurea
<i>Ler</i>	Lansberg <i>erecta</i> ecotype
MAMPs	microbe-associated molecular patterns
MMC	mitomycin C
MS	Murashige and Skoog
MTI	MAMP-triggered immunity
Mul	Mu-like transposon
NAC	NO APICAL MERISTEM (NAM), ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR (ATAF), CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PEG	polyethylene glycol
<i>Pst</i> DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
PI	propidium iodide
QC	quiescent center

Rep-MYB	repressor-type R1R2R3-Myb transcription factor
RT-PCR	reverse transcription-PCR
RAD17	Orthologue of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> RAD17
rLUC	<i>renilla reniformis</i> luciferase
ROS	reactive oxygen species
sGFP	superfolder green fluorescent protein
SOG1	SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1
TSS	transcription start site
UV	ultraviolet

緒言

DNA 損傷

DNA は遺伝情報を媒介する物質であり、細胞分裂により生まれた娘細胞に、親細胞と全く同じ遺伝情報を伝える働きをもつ。そのことから、DNA が損傷を受け、正しく修復されなかった場合、変異を持つゲノム DNA が娘細胞に伝達されることでゲノムの恒常性が失われ、生物の生存に関わる大きな問題となる。例えば、ヒト細胞では一日に数万箇所 DNA 損傷が生じていることから (Lindahl and Barnes, 2000)、ヒトのみならず、すべての生物は常に DNA 損傷の危険に曝されていると考えられる。DNA 損傷は内的小および外的要因により生じる。内的小要因としては、DNA 複製エラーや複製フォークの進行阻害、代謝過程で生じる活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が挙げられる。また、加水分解による DNA 塩基の脱離や、酵素によらない DNA 塩基のメチル化によっても、一日に数千の DNA の傷害が起きることが報告されている (Jackson and Bartek, 2009)。一方、外的小要因としては、X 線や γ 線などの放射線照射や、ブレオマイシンやゼオシンなどの放射線類似薬剤が知られている (Manova and Gruszka, 2015)。これらは、DNA の二本鎖切断を引き起こす。また、紫外線照射によっても、ピリミジン塩基同士の架橋を生じることで DNA 複製が妨げられる (Frohnmeier and Staiger, 2003)。植物では、土壌に含まれる過剰なホウ素やアルミニウムに加え、病原菌感染が DNA 損傷を引き起こす要因として報告されている (Sakamoto *et al.*, 2011; Song and Bent, 2014; Sjogren *et al.*, 2015)。

動物の DNA 損傷応答

動物細胞では、DNA 損傷が起きるとセンサーキナーゼである Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) と ATM and Rad3-related (ATR) が損傷 DNA を認識する。ATM は DNA 二本鎖切断、ATR は DNA 複製ストレスおよび DNA 一本鎖切断が起きた時に働くことが知られている (図 1)。

DNA 二本鎖切断が起こると、初めに切断部位に MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) 複合体が結合し、それを足場として ATM が切断部位にリクルートされる。リクルートされた ATM は自己リン酸化することで活性化型となり、多くの基質をリン酸化する。例えば、活性化型 ATM はヒストンタンパク質である H2AX をリン酸化することが報告されている (Savic *et al.*, 2009)。ATM による H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) は、DNA 損傷後数分以内に起き、損傷部位を中心に 500 kb 以上のクロマチン領域にまで広がることが観察されている。そして、リン酸化された H2AX は DNA 修復因子やク

ロマチン構造制御因子を集合させ、損傷 DNA の修復を助ける役割を果たす (Maréchal *et al.*, 2013)。また、活性化型 ATM は、H2AX の他にも、Checkpoint-2 (CHK2) をリン酸化することが知られている。CHK2 タンパク質は、動物の DNA 損傷応答において中心的役割を果たす p53 転写因子のリン酸化および活性化に関わる (Hirano *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 2000)。p53 は DNA 損傷に応じた下流因子の転写制御を統御することで、細胞周期の停止や DNA 修復、アポトーシスによる細胞死などの DNA 損傷応答を引き起こす (Bode and Dong, 2004; Bieging *et al.*, 2014)。特に、p53 の標的遺伝子である p21^{Cip/Waf} は、サイクリン-Cyclin-dependent kinase (CDK) の複合体に直接結合することによりその活性を阻害し、G1/S 期や G2/M 期での細胞周期停止に関わる (Waldman, *et al.*, 1995; Bunz *et al.*, 1998)。さらに、活性化型 ATM は、p53 と p53 タンパク質の分解に関わる MDM2 タンパク質をリン酸化することが知られている。MDM2 タンパク質は E3 リガーゼをコードし、DNA 損傷を受けていない時は p53 と直接結合することで p53 タンパク質を分解に導く。しかし、活性化型 ATM により p53 および MDM2 がリン酸化されることで、両者の結合が阻害され、p53 タンパク質が安定化することが知られている (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998; Meek, 2009)。それにより、細胞内の p53 タンパク質が蓄積し、DNA 損傷応答が引き起こされる (図 1)。

一方で、DNA 複製ストレスおよび DNA 一本鎖切断が起こると、Rreplication protein A (RPA) が一本鎖 DNA に結合し、それを足場に ATR と ATR-interacting protein (ATRIP) 複合体がリクルートされ、ATR 分子同士がリン酸化し合う。その後、RAD17-Replication factor C (RFC) 複合体 (クランプローダー) が RPA に覆われた 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の境界を認識して結合し、続いて 2 本鎖 DNA 側に RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1 複合体、チェックポイントクランプ) がリクルートされる。そして、DNA topoisomerase II binding protein 1 (TopBP1) が ATR の自己リン酸化部位および RAD9 を認識して両者を架橋することにより ATR は活性化型となる。活性化した ATR は、Checkpoint-1 (CHK1) をリン酸化することで活性化させる (Sancar *et al.*, 2004)。そして活性化状態の ATR および CHK1 は、ATM や CHK2 と同様に、p53 をリン酸化することにより活性化させ (Tibbetts *et al.*, 1999; Shieh *et al.*, 2000)、DNA 修復や細胞周期の進行阻害、アポトーシスによる細胞死の誘導などの DNA 損傷応答を誘導する。さらに、CHK1 は CDK 活性を阻害する WEE1 キナーゼの活性化や、CDK 活性を促進する Cell division cycle 25 (CDC25) の活性を阻害することで、細胞周期の進行を抑制する (Sancar *et al.*, 2004) (図 1)。

植物の DNA 損傷応答

植物においても、動物と同様に、ATM が DNA 二本鎖切断、ATR が DNA 一本鎖切

断や複製ストレスの認識に関わる (Hu *et al.*, 2016)。そのことから、シロイヌナズナの *atm* 欠損変異体は DNA 二本鎖切断を引き起こす γ 線照射やブレオマイシン、ゼオシンに対して野生型よりも高い感受性を示し、*atr* 機能欠損変異体は DNA 複製阻害剤であるヒドロキシ尿酸やアフィディコリン、UV-B 照射に対して生育阻害を示すことが報告されている (Garcia *et al.*, 2003; Culligan *et al.*, 2004)。また、DNA 損傷部位に集合して ATM および ATR の足場となる因子 (MRN、RPA など) のオルソログも植物に存在することから、DNA 損傷の認識に関しては、動植物で同様のメカニズムが働いている可能性が考えられる (図 2) (Heitzeberg *et al.*, 2004; Friesner *et al.*, 2005; Sweeney *et al.*, 2009; Amiard *et al.*, 2010; Aklilu *et al.*, 2014)。

一方、植物は、動物の DNA 損傷シグナル伝達に重要な CHK1 や CHK2、p53 などのオルソログを持っていないことが知られている。代わりに、植物特異的な転写因子である SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1) がその役割を担うことで DNA 損傷応答シグナルを伝達していると考えられている (図 2) (Yoshiyama *et al.*, 2009; Yoshiyama *et al.*, 2014)。SOG1 は植物特異的な NAC (NAM, ATAF, and CUC) 型転写因子で、N 末端領域に DNA への結合に重要とされる NAC ドメインを持ち、C 末端領域に転写制御ドメインをもっている。そして、SOG1 は ATM および ATR によりリン酸化されることで活性化し、その下流で DNA 修復や細胞周期停止などに関わる数百種類の遺伝子の発現を誘導する (Yoshiyama *et al.*, 2009; Yoshiyama *et al.*, 2013; Sjogren *et al.*, 2015)。*sog1* 機能欠損変異体では、DNA 損傷に応答したそれら遺伝子の発現誘導が見られないことから、植物では SOG1 が DNA 損傷応答の中心的役割を果たしていることが予想される。しかしながら、SOG1 がどのような因子を直接転写制御することで、植物の DNA 損傷応答を統御しているのかについては、限られた知見しか報告されていない。

DNA 損傷チェックポイント

真核生物の体細胞分裂は、DNA 複製を行う S 期と、有糸分裂および細胞質分裂を行う M 期、そして、その間の G1 期および G2 期で構成される。これらの細胞周期の進行には、サイクリン-CDK 複合体によるリン酸化活性が必須となる。さらに、サイクリンおよび CDK は複数存在し、真核細胞では細胞周期の各ステージに働くサイクリンと CDK の組み合わせを変えることで、標的とする基質を変化させ、秩序立った細胞周期の進行を可能としている。例えば、動物細胞では、G1 期にサイクリン D-CDK4 または CDK6 複合体、G1 期から S 期への移行にサイクリン E-CDK2 複合体、S 期から G2 期にかけてサイクリン A-CDK1 または CDK2 複合体、G2 期から M 期への移行にはサイクリン B-CDK1 複合体が働く (図 3) (Malumbres and Barbacid, 2009)。植物

では、G1 期および S 期にかけてはサイクリン D-CDKA 複合体やサイクリン A3-CDKA 複合体が、G2 期から M 期にかけてはサイクリン A またはサイクリン B-CDKB 複合体およびサイクリン D-CDKA 複合体が働く。特に、CDKB2 は G2 後期から M 期にかけて特異的に発現誘導されることが知られている（図 3）（Komaki and Sugimoto, 2012）。一方で、細胞周期の進行を抑制、停止させる機構として細胞周期チェックポイントが存在する。特に、ゲノム DNA に損傷がある時に細胞周期が進行してしまうと、遺伝情報の恒常性が損なわれてしまうことから、細胞周期の特定のステップにおいてゲノム DNA に異常がないか監視を行っている。その機構は、DNA 損傷チェックポイントと呼ばれている。そして、DNA 損傷を感知した細胞は、G1/S 期チェックポイント、もしくは S 期チェックポイント、G2/M 期チェックポイントを活性化させ、CDK 活性を抑えることにより細胞周期の進行を一時的に停止させて損傷 DNA の修復を行う。また、損傷が重篤である場合には、動物では、アポトーシスによるプログラム細胞死が誘導される（Sancar *et al.*, 2004; Brnzei and Foiani, 2008）。DNA の修復後には、CDK 活性の抑制が解除され、細胞周期の進行が再開される。このような細胞周期進行の厳密な制御により、DNA 損傷が起きた場合においても、遺伝情報の恒常性を維持することが可能となっている。

動物では、DNA 損傷チェックポイントの破綻は腫瘍形成の主な原因であることから、その分子機構に関する研究は盛んに行われ、多くの知見が得られている（図 3）。例えば、DNA 損傷を受けると、G1 期では、CHK2 にリン酸化されることで安定化した p53 が、CDK 阻害因子 p21^{Cip/Waf1} をコードする *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A* (CDKN1A) 遺伝子の発現誘導を行う。そして、p21^{Cip/Waf} は、G1 期の進行に必要なサイクリン D-CDK4 または CDK6 複合体や、S 期への移行に必要なサイクリン E-CDK2 複合体に直接結合することで、これらの CDK 活性を抑制する。また、CHK2 は、CDK を活性化する CDC25A をリン酸化することで、CDC25A を核外に排出してタンパク質分解を促進し、サイクリン-CDK 複合体の活性化を阻害する。S 期チェックポイントでは、CHK2 に加えて CHK1 も CDC25A の活性を抑制し、S 期に働くサイクリン A-CDK1 または CDK2 複合体の活性を下げる。また、CHK1 は CDK の不活性化に関わる WEE1 を直接リン酸化することで活性化させ、CDK 活性を阻害する。G2/M 期チェックポイントでは、M 期の移行に重要なサイクリン B-CDK1 複合体の活性を阻害するため、CHK2-p53-p21^{Cip/Waf} 経路や、CHK1-WEE1 経路が機能することに加えて、CDC25A、CDC25B、CDC25C が CHK1 および CHK2 にリン酸化されることにより不活化される（図 3）（Shaltiel *et al.*, 2015）。

一方、植物の DNA 損傷チェックポイントでは、動物とは異なり、G2/M 期チェックポイントが主に働く。DNA 損傷に応答して初期に発現誘導される CDK 阻害因子 SIAMESE-RELATED 5 (SMR5) および SMR7 が、おそらく CDKA と結合しサイク

リン D-CDKA 複合体の活性を抑制することが考えられている (Yi *et al.*, 2014; Van Leene *et al.*, 2010)。さらに、サイクリン B-CDK 複合体の活性を抑制するために、サイクリン B の発現を誘導する活性化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Act-MYB) の発現が減少し、抑制化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Rep-MYB) タンパク質が CDK 活性の低下に伴って安定化することで、持続的なサイクリン B の発現低下を実現している (Chen *et al.*, 2017)。加えて、CDKB2 の転写が抑制され、CDKB2 タンパク質が積極的に分解されることが知られている (Adachi *et al.*, 2011)。以上の G2/M チェックポイントに関する制御は、SOG1 によって統括されることが明らかにされている (図 3) (Preuss and Britt, 2003; Yoshiyama *et al.*, 2009; Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。

DNA 二本鎖切断の修復

細胞は DNA に損傷を受けると、細胞周期を停止させ、速やかに損傷 DNA の修復を行う。特に、DNA 二本鎖切断は染色体の欠失を伴う損傷であり、生物の生存に重大な影響を及ぼす。真核生物における DNA 二本鎖切断の修復機構を大きく分けると、相同組換えによる修復と非相同末端結合による修復の二種類が存在する (図 4)。

相同組換えでは、初めに損傷部位に集合した MRN 複合体に C-terminal binding protein 1 interacting protein (CtIP) / Retinoblastoma binding protein 8 (RBBP8) が結合し、3'-5'エキソヌクレアーゼを活性化する。これにより切断部位から二本鎖 DNA の片方の削り込みが行われる。その後、露出した一本鎖 DNA の部分を RPA タンパク質が覆う。次に、RAD51-Breast cancer susceptibility gene 2 (BRCA2) 複合体が RPA と入れ替わり、相同組換えが開始する。この時、BRCA1 は RAD51-BRCA2 複合体の足場として重要な働きをする。RAD51 は RAD54 と協調して一本鎖 DNA を鋳型となる DNA 配列に入れ込み、コヒーシンなどの染色体構造維持に関わるタンパク質の働きにより相同 DNA 配列同士を整列させる。その後、RAD51 がその場を離れ、DNA ポリメラーゼ δ により DNA 合成が開始し、ホリデイ構造 (holliday junction) が形成される。次に、ホリデイ構造の交差した部分がエンドヌクレアーゼにより切断され、その後解離し、DNA リガーゼ I による DNA 連結反応により相同組換えが完了する (図 4) (Chapman *et al.*, 2012)。

一方、非相同末端結合による修復には少なくとも 4 つの経路が存在する。その中でも、主要な非相同末端結合経路 (canonical non-homologous end joining: C-NHEJ) では、KU70 および KU80 のヘテロ二量体が初めに損傷部位に結合する。その後、KU70/80 複合体が足場になることで、DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) を損傷箇所にリクルートし、活性化する。続いて、X-ray repair complementing defective repair protein in Chinese hamster cells 4 (XRCC4) が KU70 に結合し、損傷部位を近づ

ける。最後に DNA リガーゼ IV の働きにより損傷部位が連結され、修復される (図 4) (Shrivastav *et al.*, 2008)。

DNA 二本鎖切断の修復に相同組換えまたは非相同末端結合のどちらの機構が選択されるかは、DNA 損傷を受けた細胞の細胞周期に影響される。例えば、相同組換えによる DNA 修復は、S 期で複製された姉妹染色分体を主な鋳型として用いるため、S 期の DNA 複製後から G2 期で行われる。一方、非相同末端結合は細胞周期に関係なく、常に活性を保持している (Chapman *et al.*, 2012; Bétermier *et al.*, 2014)。さらに、DNA 二本鎖切断の修復経路の選択は、細胞周期の状況に加えて、損傷が起きたクロマチンの場所によっても影響を受ける。例えば、ヘテロクロマチン領域であるペリセントロメアで DNA 二本鎖切断が起きた場合には、細胞周期に依存して一方の修復経路が活性化されるが、セントロメアでは、細胞周期に関係なく両方の修復機構が活性化される (Tsouroula *et al.*, 2016)。このような DNA 修復機構は、真核生物で非常に高く保存されており、植物においても相同組換えおよび非相同末端結合に関わる遺伝子の多くのオルソログが存在する。また、遺伝学的な解析から、植物も動物と同様の修復機構を持っていると考えられている (Knoll *et al.*, 2014)。

本研究の目的

植物は、動物の DNA 損傷応答のシグナル系に関わる多くの因子のオルソログを持たないことから、他の真核生物とは異なる独自の DNA 損傷応答系を進化の過程で獲得してきたと考えられる。特に植物特異的な NAC 型転写因子である SOG1 がマスターレギュレーターとして働くことにより、その下流で、細胞周期の G2 期停止や DNA 倍加の促進、DNA 修復、幹細胞死の誘導、静止中心 (quiescent cell: QC) の分裂、といった細胞種によって異なる応答が誘導されることが分かっている。しかし、SOG1 がどのようにこれらのイベントを統御し、器官レベルの DNA 損傷応答を成し遂げているのかは明らかにされていなかった。そこで本研究では、SOG1 の標的遺伝子を明らかにすることにより、SOG1 を中心とした DNA 損傷応答制御系の基本回路を解明することを目的とした。

第 1 章では、SOG1 の標的遺伝子を同定し、SOG1 が制御する応答を明らかにするとともに、動物の DNA 損傷応答のマスターレギュレーターである p53 の標的遺伝子と比較解析することで、両者の機能的役割における類似点や相違点を検討した。さらに、得られた標的遺伝子の情報を基に、SOG1 の転写制御様式について調べるとともに、SOG1 の植物免疫応答における役割についても解析した。第 2 章では、SOG1 の標的遺伝子である別の NAC 型転写因子 ANAC044、ANAC085 の DNA 損傷応答における役割について解析した。

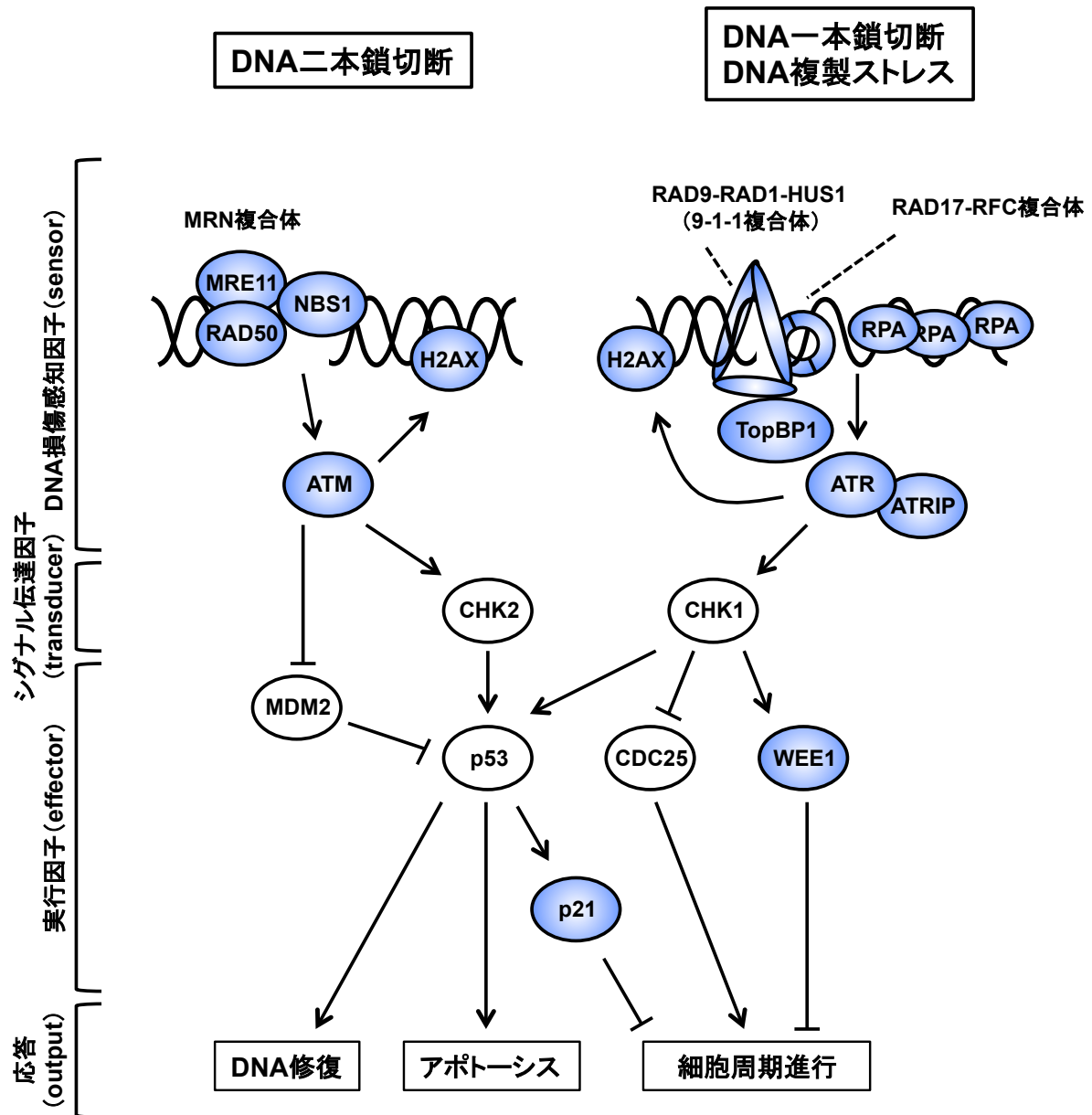


図 1. 動物の DNA 損傷応答経路

DNA 二本鎖切断が起こると、切断部位に MRN 複合体がリクルートされ ATM が活性化する。一方、DNA 一本鎖切断や複製ストレスが起きると、9-1-1 複合体や RAD17-RFC 複合体、RPA 等がリクルートされ ATR が活性化される。ATM および ATR は CHK2 や CHK1 をリン酸化することで活性化し、p53 をはじめとする複数の因子を活性化もしくは不活性化することで、DNA 修復やアポトーシス、細胞周期チェックポイントを制御する。動物の DNA 損傷応答に関わる因子の中で、機能的なオルソログが植物にも存在するものは青色、しないものは白色で示した。

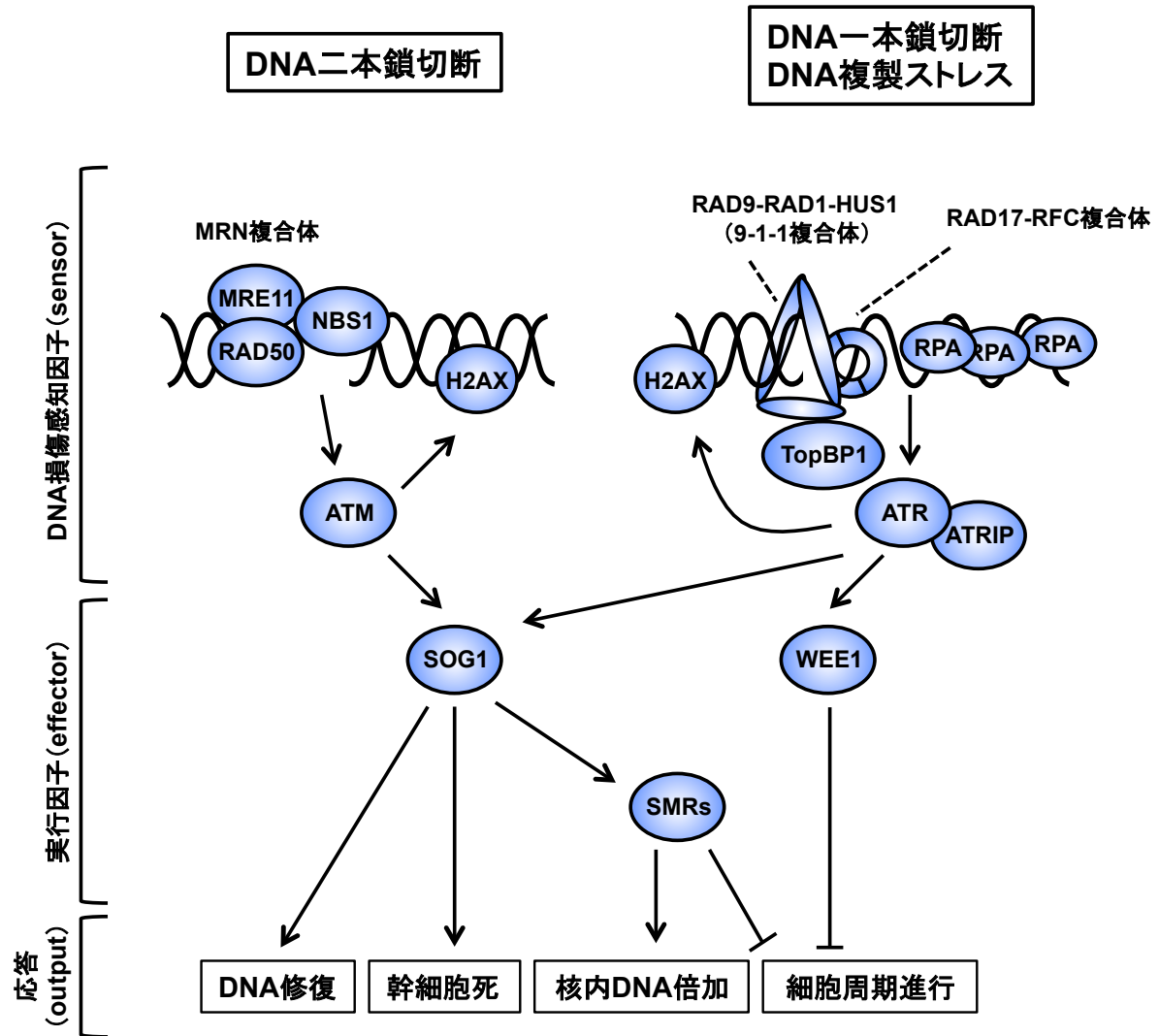
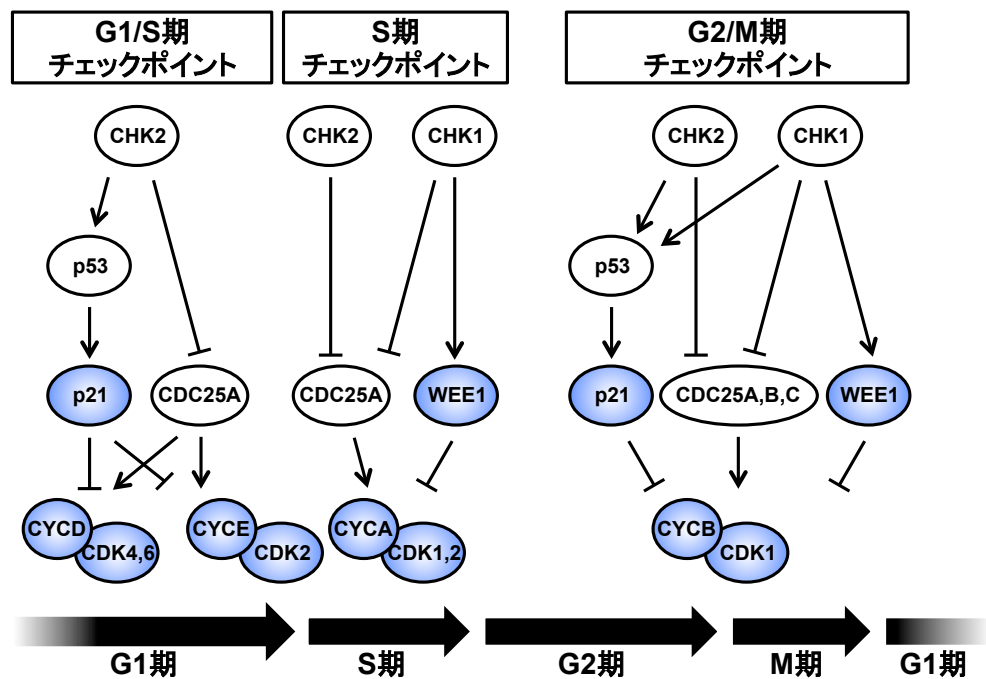


図 2. 植物の DNA 損傷応答経路

動物と同じく、DNA 二本鎖切断もしくは DNA 一本鎖切断や複製ストレスが起きると、ATM もしくは ATR が活性化される。この時に働く一部の DNA 損傷感知因子 (MRN 複合体、9-1-1 複合体、RAD17-RFC 複合体、TopBP1、ATRIP) の生化学的機能については植物で詳細に調べられていないため、動物や酵母で得られている知見を基に作図した。活性化した ATM および ATR は NAC 型転写因子 SOG1 をリン酸化し、活性化させる。SOG1 は数百遺伝子の転写を制御することで、DNA 修復や幹細胞の細胞死、DNA 倍加の誘導、細胞周期の停止などの DNA 損傷応答を統御する。

<動物>



<植物>

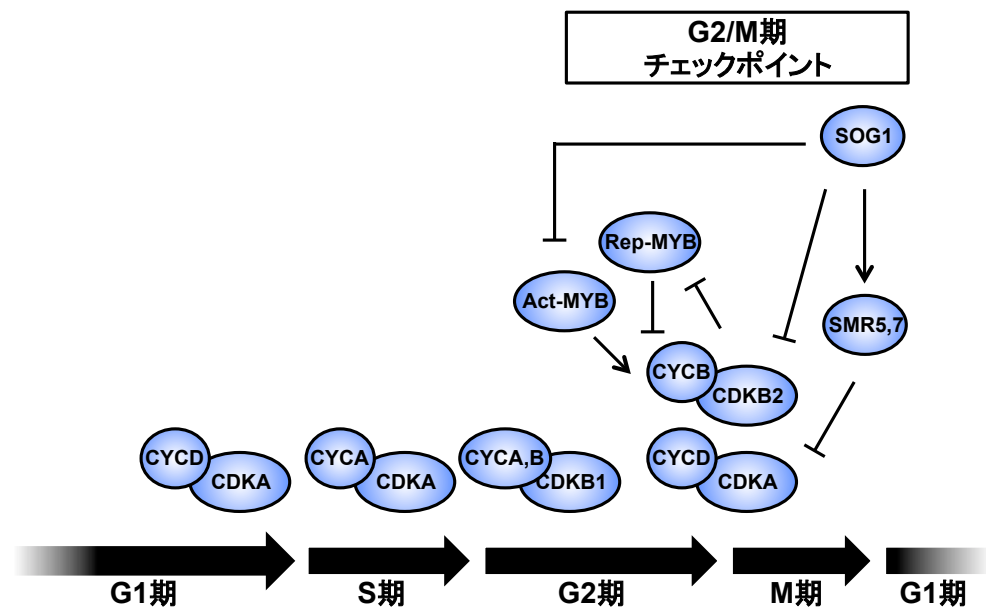


図 3. 動植物の DNA 損傷チェックポイントの比較

DNA 損傷が起きた場合には、G1/S 期チェックポイント、S 期チェックポイント、そして G2/M 期チェックポイントが活性化し、細胞周期特異的に働くサイクリン-CDK 複合体の活性を抑えることにより、それぞれの周期での細胞周期の進行を停止させる。図では、現在までに明らかにされている動物および植物における DNA 損傷チェックポイントを示す。動物の DNA 損傷チェックポイントに関わる因子の中で、機能的なオルソログが植物にも存在するものは青色、しないものは白色で示した。

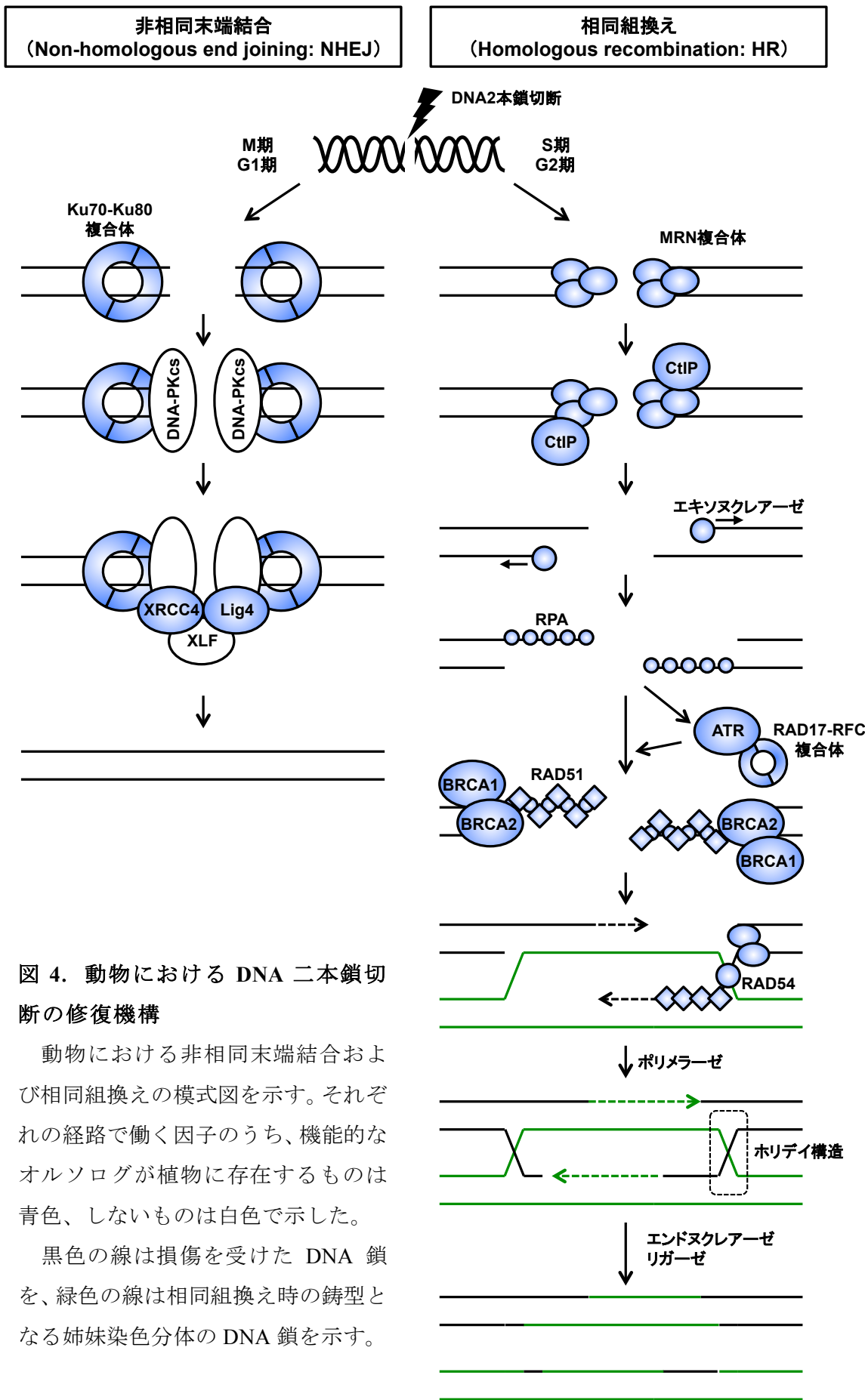


図 4. 動物における DNA 二本鎖切断の修復機構

動物における非相同末端結合および相同組換えの模式図を示す。それぞれの経路で働く因子のうち、機能的なオルソログが植物に存在するものは青色、しないものは白色で示した。

黒色の線は損傷を受けた DNA 鎖、緑色の線は相同組換え時の鋳型となる姉妹染色分体の DNA 鎖を示す。

第 1 章

SOG1 の標的遺伝子に関する解析

1-1. 序論

動物細胞では、DNA 損傷を受けると、センサーキナーゼである ATM と ATR が損傷 DNA を認識し、そのシグナルを伝達するために転写因子である p53 を活性化する。p53 は、動物の DNA 損傷応答の中心的役割を果たしており、下流の因子の転写制御を行うことで、DNA 修復や細胞周期の停止、プログラム細胞死などを引き起こす。一方、植物では、ATM と ATR の下流で植物特異的な NAC 型転写因子である SOG1 が中心的に働くことで、DNA 損傷応答を引き起こしている。SOG1 は、N 末端領域に DNA 結合に必要な NAC ドメインと、C 末端領域に転写制御ドメインを持ち、ATM が転写制御ドメイン内に存在する 5 つの SQ (セリン-グルタミン) モチーフのうち、いずれかまたは全てをリン酸化することにより、SOG1 を活性化することが報告されている (Yoshiyama *et al.*, 2013; Yoshiyama *et al.*, 2017)。ATR も同様に、SOG1 のリン酸化に関与していることが示されている (Sjogren *et al.*, 2015)。DNA 二本鎖切断によって活性化した SOG1 は、その下流で DNA 修復や細胞周期停止などに関わる 249 遺伝子の発現を誘導する (Yoshiyama *et al.*, 2009)。また、*sog1* 変異体だけでなく、*atm* 変異体においてもそのほとんどの遺伝子 (240 / 249) が発現誘導されないことから (Culligan *et al.*, 2006)、SOG1 と ATM が DNA 二本鎖切断に応答した転写制御に重要な役割を果たしていると考えられる。植物は DNA 損傷を受けると、DNA 修復や細胞周期の停止、DNA 倍加の誘導や、幹細胞の細胞死、根の QC の分裂の活性化などの DNA 損傷応答を引き起こす。しかし、*sog1* 変異体では、それら応答が観察されないことから (Preuss and Britt, 2003; Furukawa *et al.*, 2010; Adachi *et al.*, 2011; Yoshiyama *et al.*, 2013)、植物の DNA 損傷応答において SOG1 は重要な役割を果たしていると考えられる。

現在までに、DNA 損傷に応じて、SOG1 がいくつかの因子を直接転写制御していることが明らかにされている。例えば、CDK 阻害因子である *SMR5* および *SMR7* や、 $O_2^{\cdot -}$ を触媒して H_2O_2 を産生する *FLAVIN-DEPENDENT-MONOOXYGENASE (FMO1)*、そして細胞周期因子である *CYCLIN B1;1 (CYCBI;1)* は、SOG1 により直接発現誘導される (Yi *et al.*, 2014; Chen and Umeda, 2015; Weimer *et al.*, 2016)。また、*in vitro* ゲルシフトアッセイにより、SOG1 タンパク質は DNA 修復に関わる *AtBRCA1* 遺伝子プロモーターに結合することも報告されている (Sjogren *et al.*, 2015)。しかし、DNA 損傷により発現変動する数百種類もの遺伝子の内、SOG1 はどのような遺伝子を直接転写制御することで DNA 損傷応答を統御しているのか、未だ全体像は明らかにされていない。

SOG1 は植物特異的な NAC 型転写因子ファミリーに属している。シロイヌナズナには 117 個の NAC 型転写因子がコードされ、これまでに幹細胞維持や細胞壁形成な

ど植物の形態形成に関わるものだけでなく、老化や生物および非生物ストレスの応答にも関わることが報告されている (Aida *et al.*, 1997; Kubo *et al.*, 2005; Puranik *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016)。NAC 型転写因子の DNA 結合様式に関しては、初めに ANAC019 について解析が行われ、CGT[G/A]配列 (NAC-binding sites: NACBSs) に結合することが報告されている (Olsen *et al.*, 2005)。その後、ANAC055 や ANAC072、ORE1、ATAF1、VND7、VOZ2、ANAC017 など NACBSs に結合することが示されている (Tran *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2013)。一方で、NACBSs とは異なる配列を認識し、結合する NAC 型転写因子も多数報告されている。例えば、葉の老化に関わる ANAC016 は GATTGGAT(A/T)XA 配列を認識し (Sakuraba *et al.*, 2015)、ROS に応答する NAC 型転写因子である JUB1 は TGCCGTNNNNNNNACG を認識する (Wu *et al.*, 2012)。さらに、細胞壁形成に関わる NAC 型転写因子 (SND1、VND7、VND6) は (T/A)NN(C/T)(T/C/G)TNNNNNNNA(A/C)GN(A/C/T)(A/T) に結合することが知られている (Zhong *et al.*, 2010)。

近年、DNA 損傷応答が植物免疫に関与することを示唆する結果が複数報告されている (Song and Bent, 2014; Yan *et al.*, 2013)。植物の免疫応答は、微生物関連分子パターン (Microbe-associated molecular patterns: MAMPs) を認識して免疫を活性化させる MAMP 誘導免疫 (MAMP-triggered immunity: MTI) と、病原菌が MTI を阻害するために宿主細胞内に分泌するタンパク質 (effector) を検出して、MAMP 誘導免疫よりもより強い免疫応答を引き起こすエフェクター誘導免疫 (Effector-triggered immunity: ETI) の二段階により構成される (Dodds and Rathjen, 2010)。宿主植物細胞が細胞表面に局在するパターン認識レセプター (Pattern recognition receptors: PRRs) により MAMPs を認識すると、MTI が ROS の産生や Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の活性化によって、細胞壁の強化やファイトアレキシン等の抗菌タンパク質の発現を誘導し、さらなる病原菌の侵入を抑える (Boller and Felix, 2009)。一方、宿主細胞内で病原菌から分泌されたエフェクタータンパク質が認識されると、ETI が迅速に抵抗性を誘導し、感染細胞でしばしば過敏反応によるプログラム細胞死を引き起こす (Jones and Dangl, 2006; Dou and Zhou, 2012)。そして、MTI と ETI の下流で、植物免疫に関わるホルモンとして知られるサリチル酸 (Salicylic acid: SA) が生合成される。サリチル酸シグナル系では転写補助因子 NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1 (NPR1) が中心的な役割を担っており、サリチル酸蓄積量に依存して *PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 (PRI)* などの防御関連遺伝子の転写を誘導し、細胞死を引き起こすことにより、病原菌の侵入を防いでいる (Fu and Dong, 2013; Yan and Dong, 2014)。最近の研究で、病原細菌 *Pseudomonas syringae pv. tomato (Pst)* DC3000 の感染により、宿主細胞内で DNA 損傷マーカーであるリン酸化 H2AX (γ -H2AX) が蓄積していることから、DNA 損傷が引き起こされることが明らかにされ

ている (Song and Bent, 2014)。また、外から植物にサリチル酸を処理すると、処理した細胞内で DNA 損傷が引き起こされることが報告されている (Yan *et al.*, 2013)。それゆえ、植物免疫応答におけるサリチル酸シグナル系は DNA 損傷応答を活性化させることが考えられている。さらには、*atm atr* 二重欠損変異体では病原細菌が感染しやすくなることから、DNA 損傷応答が病原細菌の感染応答に関わっている可能性が考えられる (Song and Bent, 2014)。また、相同組換え因子をコードする *AtRAD51* および *AtRAD17* の機能欠損変異体は、病原細菌に対して野生型よりも高い罹病性を示すことが知られている (Wang *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013)。そして、*AtRAD51* と *AtRAD17* は、*PR1* の発現誘導に関わることから (Wang *et al.*, 2010)、これら DNA 修復因子は *PR1* の発現制御を介して病原菌に対する抵抗性の獲得に寄与する可能性が考えられる。また近年、細胞周期制御因子が植物免疫応答に重要な役割を担うことが示されている。例えば、CDK 阻害因子である SIAMESE (SIM) や SMR1 は病原菌感染後の ETI 経路を介したサリチル酸の蓄積や (Wang *et al.*, 2014; Hamdoun *et al.*, 2016)、CDK の活性制御因子で知られる RETINOBLASTOMA-RELATED 1 (RBR1) の高リン酸化を介して、ETI によるプログラム細胞死の誘導に関わるということが報告されている (Wang *et al.*, 2014)。E2F ファミリーの一つである転写因子 DP-E2F-LIKE1 (DEL1) はサリチル酸生合成遺伝子の発現を直接抑制することにより、植物の成長と免疫応答のバランスを制御することが知られている (Chandran *et al.*, 2014)。しかし、DNA 損傷応答に関わる SOG1 が植物免疫応答の活性化に関わるのかどうかは明らかにされていない。

第1章では、SOG1 によって直接制御される遺伝子を網羅的に探索し、146 個の SOG1 標的候補遺伝子を同定した。これら標的候補遺伝子の中には、DNA 修復や細胞周期進行抑制、植物免疫、ROS の産生、植物ホルモン応答などに関わる因子が含まれていた。さらに、これらの標的遺伝子について解析することにより、動物の DNA 損傷応答で中心的な役割を果たす p53 と SOG1 との機能的役割の類似点および相違点について検討した。また、SOG1 が結合する DNA 結合配列の探索を行い、SOG1 が CTT(N)₇AAG 配列に結合することを明らかにした。同時に、SOG1 の標的配列への結合には、C 末端側の転写制御ドメインに存在する SQ モチーフのリン酸化が必要であることも見出した。最後に、SOG1 が病原真菌 *C. higginsianum* に対する抵抗性に必要であることを示し、SOG1 が制御する DNA 損傷応答系が植物免疫応答に関与することも明らかにした。

1-2. 材料と方法

植物材料

本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を実験材料として用いた。本章では、Columbia-0 (Col-0) を野生型植物として用いた。*sog1-1* (Yoshiyama *et al.*, 2009)、*sog1-7* (Sjogren *et al.*, 2015)、*ProSOG1:SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1(5A)-MYC* (Yoshiyama *et al.*, 2013)、*pad4-1* (Jirage *et al.*, 1999) は過去に報告されているものを使用した。T-DNA 挿入変異体 *sog1-101* (GABI_602B10) は The Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (<http://arabidopsis.info>) より得た。T-DNA の挿入の確認には、表 1 に示した「*sog1-101_genotyping_LP*」、「*sog1-101_genotyping_RP*」、「*GABI_T-DNA_LB*」のプライマーを用いた。また、*sog1-1* の *RPS5* 遺伝子座の確認には、表 1 に示した、「*RPS5_genotyping_F1*」、「*RPS5_genotyping_F2*」、「*RPS5_genotyping_F3*」、「*RPS5_genotyping_R*」を用いた。

プロモーターレポーターラインの作出のため、*AtRAD51* (*AT5G20850*)、*AtBRCA1* (*AT4G21070*)、*AtPARP2* (*AT2G31320*)、*AtRAD17* (*AT5G66130*) の翻訳開始コドンから上流約 2 kb または 0.6 kb のプロモーター領域を、野生型植物のゲノム DNA を鋳型に表 1 に示すプライマーを用いて増幅した。その後、PCR 産物を BP 反応 (Thermo Fisher Scientific) することで、Gateway エントリベクター pDONR221 (Thermo Fisher Scientific) にクローニングし、エントリクローンを得た。そして、それぞれのプロモーターと *GUS* 遺伝子を融合したコンストラクトを作成するために、これらのエントリクローンを Gateway ディスティネーションベクター pGWB3 (Nakagawa *et al.*, 2007) と LR 反応 (Thermo Fisher Scientific) した。得られたコンストラクトは、pMP90 を保持する *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株に形質転換し、花序浸し法により野生型植物および *sog1-1* に導入した (Clough and Bent, 1998)。形質転換体は、ハイグロマイシン (20 mg/L) を含む下記の MS 寒天培地で薬剤選抜により得た。

植物の生育条件

シロイヌナズナの種子は 70%エタノールで滅菌後、MS 液体培地[0.5 x MS salts、0.5 g/L 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)、1 % sucrose、1 x vitamin (pH 6.3)]、または MS 寒天培地[0.5 x MS salts、0.5 g/L MES、1 % sucrose、1 x vitamin、0.4 % Phytoigel (Sigma-Aldrich) (pH 6.3)] 上に無菌播種した。4°C 暗所において 2 日間の低温処理を施した後、23°C 連続照明下において生育させた。ゼオシン (zeocin, Thermo Fisher Scientific) は任意の終濃度となるよう、50 °C を下回ったオートクレーブ滅菌後の MS

寒天培地または MS 液体培地に添加した。

マイクロアレイおよび統合クラスター解析

2 日間の低温処理を施した種子を、MS 液体培地の中で穏やかに攪拌 (70 rpm) しながら 2 週間生育させた。その後、終濃度が 15 μ M になるようにゼオシンを加え、2 時間培養した後に、Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen) を用いて total RNA を抽出した。その後の Cyanine-3 ラベル化 cDNA の合成から Agilent-034592 Arabidopsis Custom Microarray へのハイブリダイズ、Agilent DNA Microarray Scanner (G2539A ver.C) を用いたスキャンニングに至るまでの過程は、理化学研究所の関原明博士の研究グループにより行われた。以上の実験を独立して 2 回行い、得られたデータを Gene Expression Omnibus (GEO) ウェブサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Barrett *et al.*, 2007) に登録した (GEO accession number : GSE106154)。データ解析は、Agilent が規格するアルゴリズムにより標準化されたデータを用いて行った。ゼオシン処理および未処理時の遺伝子発現を比較し、その発現変動レベル (Fold change: FC) が、独立して行われた 2 回の実験で、それぞれ 2 倍以上増加もしくは減少 ($\log_2(\text{FC}) \geq |1|$) した遺伝子を発現変動遺伝子とした。

遺伝子発現プロファイルの統合クラスター解析では、マイクロアレイデータセットを AtGenExpress consortium (Kilian *et al.*, 2007) から得た。Affymetrix Gene Chip を用いて得られた Raw データ (.CEL ファイル) は RMA アルゴリズム (Irizarry *et al.*, 2003) を用いて「R」(ver. 3.0.1) (R Core Team, 2013) プラットフォーム上で標準化した。標準化した値は Average difference (AD) 統計量を算出し、発現変動の大きさとした (Kadota *et al.*, 2008)。以上の過程で得られたデータセットをフリーソフトウェア「Cluster 3.0」(De Hoon *et al.*, 2004) により統計解析を行い、その結果をフリーソフトウェア「Java TreeView」(Saldanha, 2004) により視覚化した。

クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP)

ChIP は、Gendrel *et al.* (2005) および Saleh *et al.* (2008) の方法に従って行った。2 日間の低温処理を施した種子 (野生型植物、*ProSOG1:SOG1-MYC*、*sog1-1*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1(5A)-MYC*) を、MS 液体培地の中で穏やかに攪拌 (70 rpm) しながら 2 週間生育させた後、終濃度が 15 μ M になるようにゼオシンを加え、2 時間培養した。その後、植物 (2 g) を減圧環境下で 1%ホルムアルデヒドに 20 分間浸した。そして、終濃度が 0.125 M となるようにグリシンを加え、さらに減圧環境下で 5 分間、静置させた。次に、抽出したクロマチンを Digital Sonifier®

(BRANSON) を用いて平均で 500 bp 程度になるように断片化し、そのうちの 50 μ L を input 用に保存した。残りのクロマチン断片は ChIP-dilution buffer で 10 倍程度に希釈した後、Protein A アガロースビーズ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で前処理を行った。次に、前処理後のクロマチン断片を抗 Myc タグ抗体 (clone 4A6, Millipore) と反応させた後、Protein A アガロースビーズに結合させて精製した。そして、精製したクロマチン中の DNA 断片とタンパク質の架橋を解いた後、DNA 断片のみをフェノール・クロロホルム法により抽出した。DNA 断片は、表 1 に示したプライマーを用いて定量解析した。定量 PCR 反応では LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche) を用いて、95 °C 5 min で変性後、95 °C 10 秒、58 °C 10 秒、72 °C 15 秒の順で 60 サイクル増幅させる条件で解析を行った。*Mu-like transposon* (*Mul*) 遺伝子は、SOG1 の結合に関するネガティブコントロールとして用いた (Sauret-Güeto *et al.*, 2013)。ChIP シグナルは input の DNA 断片量に対して標準化した。

SOG1 の標的候補遺伝子の網羅的な探索には当研究室で行われた ChIP-sequence のデータを用いた。ゲノム上の SOG1 結合を示すシグナルの可視化にはソフトウェア「Integrative Genome Browser」(Robinson *et al.*, 2011) を用い、解析データを GEO ウェブサイトに登録した (GEO accession number : GSE106415)。

定量 RT-PCR

RNA は Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen) を用いて抽出した。その後、0.5 μ g の RNA から、ReverTra Ace[®] (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。定量 PCR は、合成した cDNA を鋳型に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) および表 1 に示したプライマーを用いて行った。PCR 反応は 95 °C 5 min で変性後、95 °C 10 秒、58 °C 10 秒、72 °C 15 秒の順で 55 サイクル増幅させて解析を行った。反応および解析は、Light Cycler 480 Real-Time PCR system (Roche) を用いた。

GUS 染色

植物は、MS 寒天培地を垂直に立てて、根が寒天培地上を這うように 7 日間生育させた。その後、15 μ M ゼオシンを含む、もしくは含まない MS 液体培地で 2 時間または 24 時間、植物を生育させた。その後、植物体を蒸留水で 2 回洗浄した後、地上部は -20 °C の 90% (v/v) のアセトンで 1 時間固定した後、リン酸バッファー (pH 7.0) で洗浄し、GUS 染色液 [100 mM sodium phosphate, 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc), 0.5 mM ferricyanide, 0.5 mM ferrocyanide (pH 7.4)] で 37 °C、9 時間、暗所で反応させた。そして、70%エタノールで 3 回洗浄した後、スライドグ

ラス上の透明化液 [chloral hydrate : glycerol : dH₂O (8 g : 1 mL : 1 mL)] に封入した。根については、植物体を蒸留水で洗浄した後、GUS 染色液の中で 37 °C、9 時間暗所で反応させた。そして、リン酸バッファーで 3 回洗浄した後、スライドガラス上の透明化液に封入した。組織の観察および撮影には微分干渉顕微鏡「Axioskop 2 Plus」(Zeiss) および「SZX16」(OLYMPUS) を使用した。

Gene ontology (GO) 解析

GO 解析は、Web 上のプログラム「agriGO」で SOG1 標的遺伝子を input として解析を行った (Du *et al.*, 2010)。そして、GO タームの *p*-value が 0.01 未満のときに有意に濃縮しているとみなした。SOG1 と p53 の標的遺伝子は、「Cytoscape」(ver. 3.3) (Smoot *et al.*, 2011) プラットフォーム上でフリープラグイン「BiNGO」(ver. 3.03) (Maere *et al.*, 2005) を使用して GO 解析を行った。この時に使用した GO ファイル「go.obo」および、アノテーションファイルであるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 用の「gene_association.tair.gz」、またマウス (*Mus musculus*) 用の「gene_association.mgi.gz」は Gene Ontology Consortium (<http://geneontology.org>) より取得した (Gene Ontology Consortium, 2004)。BiNGO による統計解析は超幾何分布検定 (hypergeometric test) によって行われ、*p*-value は Benjamini and Hochberg 法により算出した。

in silico によるコンセンサス配列の探索

SOG1 が結合する DNA 配列を予測するため、SOG1 標的遺伝子の転写開始点 (transcription start site: TSS) から 1 kb 上流の DNA 配列を「R」プラットフォームを使用して抽出し、それらを input として Web 上のプログラム「MEME」(Bailey *et al.*, 2006)、および、「Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT)-spaced dyad tool」(Helden *et al.*, 2000) で解析を行った。得られた結果は WebLogo 3 で視覚化した (Crooks *et al.*, 2004)。

AlphaScreen システムによる *in vitro* タンパク質-二本鎖 DNA 結合実験

in vitro タンパク質-二本鎖 DNA 結合実験は岐阜大学の山本義治教授の研究グループによって行われた (Tokizawa *et al.*, 2015)。結合実験には *in vitro* transcription/translation system (BioSieg) を用いて精製した FLAG タグ融合 SOG1 タンパク質と表 2 に示したビオチンラベル化、または非ビオチンラベル化 DNA オリゴを用いた。そして、AlphaScreen FLAG (M2) Detection Kit (PerkinElmer) を用いて抗 FLAG

タグ抗体に覆われたアクセプタービーズに FLAG タグ融合 SOG1 を、ストレプトアビジンに覆われたドナービーズにビオチンラベル化二本鎖 DNA を結合させ、両者を反応させた。SOG1 の結合モチーフを決めるために行った競合試験では、反応液に非ビオチンラベル化二本鎖 DNA を加えることにより行った。アクセプタービーズとドナービーズの近接 (< 200 nm) により生じる化学発光度 (AlphaScreen signal) は Enspire Multimode plate reader (PerkinElmer) を用いて測定した。

***AtRAD51* プロモーターへの変異の導入**

AtRAD51 プロモーターに変異を導入するため、大腸菌 DH5 α 内で Dam メチラーゼによりメチル化された *AtRAD51* プロモーターを含むエントリークローンを鋳型に表 1 に示した「AtRAD51_SBMm_F」、「AtRAD51_SBMm_R」プライマーを用いて PCR を行った。PCR は KOD-plus (Toyobo) を用いて 95 °C 5 分に変性後、98 °C 10 秒、58 °C 30 秒、68 °C 8 分の順で 10~20 サイクル増幅反応を行った。PCR 産物に含まれる鋳型は、メチル化部位を認識するエンドヌクレアーゼ DpnI で 37 °C で 1 時間処理した。その後、DpnI 反応液中に含まれる PCR 産物を DH5 α に形質転換させた。DNA 修復系によって環状化した PCR 産物をプラスミドとして有する DH5 α はカナマイシン (50 μ g/mL) を含む培地で選抜した。そして、プラスミドを精製後、シーケンシングにより変異導入部位を確認した。

一過性発現系によるレポーター活性の測定

野生型もしくは変異を導入した *AtRAD51* プロモーターを、LR 反応 (Thermo Fisher Scientific) により Gateway ディスティネーションベクター pAGL (Endo *et al.*, 2015) に導入し、これらのプロモーターとホタルルシフェラーゼ (*firefly luciferase: fLUC*) 遺伝子と融合したレポーターコンストラクトを得た。また、エフェクターである *sGFP*、*SOG1*、*SOG1(5A)* (Yoshiyama *et al.*, 2013) も、LR 反応により Gateway ディスティネーションベクター pA35S (Endo *et al.*, 2015) に導入し、カリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV35S) プロモーターの下流に *sGFP* または *SOG1*、*SOG1(5A)* を融合した発現ベクターを得た。ウミシイタケルシフェラーゼ (*renilla reniformis luciferase: rLUC*) のリファレンスコンストラクトは、Ohta *et al.* (2000) で報告されたものを使用した。

短日条件下 (10 時間明所、14 時間暗所) で 6 週間生育させた野生型植物または *sog1-1* の本葉から、プロトプラストを単離し、その核内にレポーターコンストラクト、エフェクターコンストラクト、リファレンスコンストラクトを polyethylene glycol (PEG)

を用いたトランスフェクション法により導入した (Yoo *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009)。その後、プロトプラストを 22 °C で 15 時間、暗所で静置し、fLUC および rLUC の活性を Dual-Luciferase reporter system (Promega) のマニュアルに従って、TriStar² LB942 (Berthold) を用いて測定した。

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) アッセイ

BiFC コンストラクトを作製するため、*GUS*、*SOG1*、*SOG1(5A)* (Yoshiyama *et al.*, 2013) のエントリークローンを Gateway ディスティネーションベクター pVN/gw または pVC/gw (Kakita *et al.*, 2007) と LR 反応させた。それにより、それぞれのコーディング領域の N 末端側に、蛍光タンパク質 Venus の N 末端側 (VN) または C 末端側 (CV) をインフレームで融合させた。これらのコンストラクトに加え、導入コントロールとして 35S:*TagRFP* コンストラクト (pBI221 (Clontech) の *GUS* を *TagRFP* に積み替えた) を野生型植物の本葉から単離したプロトプラストに導入し、22 °C、暗所の条件下で静置した。形質導入から 20 時間後、走査型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 (Olympus) を用いて観察および撮影を行った。

病原菌感染

病原細菌 *Pst* DC3000 および *Pst AvrPphB* の植物への感染は過去に報告されている方法に従った (Lu *et al.*, 2009)。具体的には 10 mM MgCl₂ の中で病原細菌を OD₆₀₀ が 0.0002 となるように懸濁し、プラスチック製のシリンジを用いて、短日条件 (10 時間明所/14 時間暗所) で育てた 5 週齢の植物の本葉に浸潤させた。それから 3 日後に、浸潤させた本葉から葉のディスクをくり抜き、10 mM MgCl₂ の中で穏やかに粉碎した。その後、段階希釈し、リファンピシン (25 µg/mL) を含む NYGB 培地 [0.5 % peptone, 0.3 % yeast extract, 2 % glycerol and 1.5 % agar] で 2 日間、28 °C で培養し、形成したコロニーの数を計測することで、本葉における単位面積あたりの細菌数を算出した。

病原真菌 *Colletotrichum higginsianum* (*C. higginsianum*) の植物への感染は、過去に報告されている方法に従った (Hiruma *et al.*, 2013)。短日条件で育てた 5 週齢の植物の本葉に 5 µL の *C. higginsianum* の孢子懸濁液 (2.5 x 10⁵ spore/mL) を落とし、接種した。接種後は植物を密閉環境で育て、高湿度条件を維持した。接種より 6 日後の炭疽病斑の面積の測定には、フリーソフトウェア「ImageJ」(Schneider *et al.*, 2012) を使用した。

表 1. プライマー配列一覧

プライマー名	配列 (5'→3')	使用目的	プライマー名	配列 (5'→3')	使用目的
AiRAD51-ChIP-F1	CCTGGTTGGGCCCTATATTTTTTC	ChIP-PCR	TRFL10-qRT-F	TGGCTAAGTCAAAGACAGTGAGG	qRT-PCR
AiRAD51-ChIP-R1	AAACGTTGAAATATAAGATTAGTC	ChIP-PCR	TRFL10-qRT-R	CTCCACTCCCACCTTTAGCA	qRT-PCR
AiRAD51-ChIP-F2	ATGATCAAGGCCGAGGAAAAGCTG	ChIP-PCR	SYN2-qRT-F	TGGACATGATTCGATGGAAAG	qRT-PCR
AiRAD51-ChIP-R2	GAGTGGAGGAAATGGCGAAACTG	ChIP-PCR	SYN2-qRT-R	TCATGAGCAAACTCTCATGTTTAT	qRT-PCR
AiRAD51-ChIP-F3	CGTTTGAATGATTAGCTTCCCATG	ChIP-PCR	DREB19-qRT-F	GCTGCTTTGGCTTACGACAG	qRT-PCR
AiRAD51-ChIP-R3	CGTCTCAAGAACGCTATTGTGATC	ChIP-PCR	DREB19-qRT-R	CCTCCGTTTCAATCACGCC	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-F1	TGCTTGTGCAAGATTGGTGC	ChIP-PCR	CYP96A11-qRT-F	TCCACCAGTTTCTTTGGGC	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-R1	TCGCATACAAGTCCAAGAGCA	ChIP-PCR	CYP96A11-qRT-R	CTCCCAAAACCGCTCTCATC	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-F2	CGTGTTCATGGCGGGATTG	ChIP-PCR	POLD4-qRT-F	CGATCTCAACGAGGATTATGAC	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-R2	ATGACGAAGCGTGTCTTCAA	ChIP-PCR	POLD4-qRT-R	TGCCACAGACAATCTTGCTGG	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-F3	ATGGGGAGAAGCTCAAGTCAGC	ChIP-PCR	AGO2-qRT-F	AGGAGGAGTCGCTGGTAGAG	qRT-PCR
AiBRCA1-ChIP-R3	GGACCTTCGATGGGCTCTC	ChIP-PCR	AGO2-qRT-R	ACTTCAGCTACACGAACGGG	qRT-PCR
AiRAD17-ChIP-F	AGGTGGTGGTCACTCTCTCA	ChIP-PCR	AT3G09020-qRT-F	TTGGAGGCAAAGACGTGTCG	qRT-PCR
AiRAD17-ChIP-R	GGGTCAATCAAACGGCATCG	ChIP-PCR	AT3G09020-qRT-R	CCGAACAATCCGCGAGTGGA	qRT-PCR
AiPARP2-ChIP-F	CAAGGGAAGCCATCGATGAAG	ChIP-PCR	TFIIB-qRT-F	AGAAGGAAATGGCCGAGCA	qRT-PCR
AiPARP2-ChIP-R	TTCGTGGAAAGGGAATGAGA	ChIP-PCR	TFIIB-qRT-R	ACCTTCTCATGAAATCACCAGC	qRT-PCR
OXI1-ChIP-F	GGTTCTTTCGCCTCCACGTA	ChIP-PCR	KRP6-qRT-F	TGTTGTAGATCTGGAGGATCA	qRT-PCR
OXI1-ChIP-R	CTGAGATTCTGGCCATGCG	ChIP-PCR	KRP6-qRT-R	CCCAAACCTCACTCACTGG	qRT-PCR
TRFL10-ChIP-F	GGCAGCACACTAACCCCTAC	ChIP-PCR	SAG101-qRT-F	CACCGATCTGCAGAAGTAGTAGC	qRT-PCR
TRFL10-ChIP-R	AGTTCCACCAAGTCTGGCTTCA	ChIP-PCR	SAG101-qRT-R	GAGCAGAGGAATGGGAAAGG	qRT-PCR
SYN2-ChIP-F	TTGTTCCGTACACCGCTTGA	ChIP-PCR	UBP21-qRT-F	TACGCTCGGTGGACCTAAG	qRT-PCR
SYN2-ChIP-R	TTGAGTGTGAAGTTTACCAGA	ChIP-PCR	UBP21-qRT-R	GCAAAATGCGCACGTTGAATC	qRT-PCR
DREB19-ChIP-F	GTGGATTGGTGCCCAAGACT	ChIP-PCR	AiRPA1A-qRT-F	ACCACCGTCTAGGGTTTCGC	qRT-PCR
DREB19-ChIP-R	GGCTACAAGACACGTGGTGA	ChIP-PCR	AiRPA1A-qRT-R	CGGCTTCAAATTCACGTCGC	qRT-PCR
CYP96A11-ChIP-F	ATCCAGTTCCTTGCACCAG	ChIP-PCR	ACT2-qRT-F	CTGGATCGGTGGTTCCATTC	qRT-PCR
CYP96A11-ChIP-R	GTTTCTAGGGAACCGCCAT	ChIP-PCR	ACT2-qRT-R	CTTGACCTCGCTCATCATAC	qRT-PCR
POLD4-ChIP-F	CCATTACTATCAGTGGCGGGA	ChIP-PCR	SOG1-qRT-F1	CTAGTCCGATCTCCGCCAA	qRT-PCR
POLD4-ChIP-R	TCCTTTAGCTTCTACGCGAC	ChIP-PCR	SOG1-qRT-R1	ACACCTCGAGGCAATCTCG	qRT-PCR
AGO2-ChIP-F	ACCTCCGATTTGGTTTAGTTCA	ChIP-PCR	SOG1-qRT-F2	TGAGTTCATCCCAACCGTCA	qRT-PCR
AGO2-ChIP-R	TGGATCTGATCGGGAAACTG	ChIP-PCR	SOG1-qRT-R2	GAGACACCGTCCCATCACTC	qRT-PCR
AT3G09020-ChIP-F	AACACGACAGCTTCTCACCA	ChIP-PCR	SOG1-qRT-F3	TAGCTACACCTGAGCCTCGAATG	qRT-PCR
AT3G09020-ChIP-R	ATCGCCCTGACTTTCGTCG	ChIP-PCR	SOG1-qRT-R3	ATTACCTCGGATGTCTCGGCAAGAG	qRT-PCR
TFIIB-ChIP-F	CAAACGTCAATCGCTGGAGA	ChIP-PCR	RPS5-qRT-F	GTTGTCATGGTCTAAAGACATTTG	qRT-PCR
TFIIB-ChIP-R	ATTAAGCTCTAGGCGCGTGC	ChIP-PCR	RPS5-qRT-R	GTACAAATCCAATGATCACTAACCA	qRT-PCR
KRP6-ChIP-F	GGAATCTCAACGGCGTTTGT	ChIP-PCR	ChACT-qRT-F	CTCGTTATCGACAATGGTTC	qRT-PCR
KRP6-ChIP-R	GTGAGCGGACGAGGTTATG	ChIP-PCR	ChACT-qRT-R	GAGTCCTCTGGCCCATAC	qRT-PCR
SAG101-ChIP-F	AGCCATTTGGGCCGATGTG	ChIP-PCR	AiPARP1-qRT-F	ATGCTACTCTGGCAGGTTCCAC	qRT-PCR
SAG101-ChIP-R	CTCCAAGTCTCCCAAGTCCC	ChIP-PCR	AiPARP1-qRT-R	AGGAGGAGCTATTCGACAGCCTTG	qRT-PCR
UBP21-ChIP_F	CCAAAACCAAGTGCGAACCA	ChIP-PCR	RPS5_genotyping_F1	TGGGAGGACGAAAGCAGACAAATAC	Genotyping
UBP21-ChIP-R	AGCCGCCATTTATTTGGGGA	ChIP-PCR	RPS5_genotyping_F2	CCGTTTCTTACCTTCACTCCAG	Genotyping
AiRPA1A-ChIP-F	ACCACCAACCGTCTAGGTCAA	ChIP-PCR	RPS5_genotyping_F3	TGAGAATGGGTTGCTGTGTG	Genotyping
AiRPA1A-ChIP-R	ACCGGAGGAGGAGTTAGGAA	ChIP-PCR	RPS5_genotyping_R	CTGAAGTTAACGGCGGGAAG	Genotyping
SMR7-ChIP-F	TAGTCTCAAACCATGGCGC	ChIP-PCR	sog1-101_genotyping_LP	ATCCTGAATACGCAACTCTCTCC	Genotyping
SMR7-ChIP-R	GAAGCTTTCAGAGGAAGATTATTAGG	ChIP-PCR	sog1-101_genotyping_RP	AAGATTATGAGTGCATCGGCTAGT	Genotyping
Mul-ChIP-F	GATTTACAAGGAATCTGTTGGTGGT	ChIP-PCR	GABI_T-DNA_LB	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	Genotyping
Mul-ChIP-R	CATAACATAGGTTTAGAGCATCTGC	ChIP-PCR	proRAD51-2k-attB1-F	aaaaagcaggctTTAGCGTCAAGTAGTTGG	Cloning
AiRAD51-qRT-F	GATCACGGGAGCTCGATAAA	qRT-PCR	proRAD51-attB2-R	agaaagctgggtTTCCTCAATCAGAGC	Cloning
AiRAD51-qRT-R	GCGGAACTCACCATATAACTCTG	qRT-PCR	proBRCA1-2k-attB1-F	aaaaagcaggctcCCCATGCTTACGCTCAC	Cloning
AiBRCA1-qRT-F	TCTTGCTCAGGGCTCACAGTTGAAG	qRT-PCR	proBRCA1-attB2-R	agaaagctgggtTTTCGATCTTCACTCAGAG	Cloning
AiBRCA1-qRT-R	TTTCCCTCCCAAGATTGCCATCATG	qRT-PCR	proRAD17-0.6k-attB1-F	aaaaagcaggctcCCATGGAAATCGATGCGGA	Cloning
AiRAD17-qRT-F	CTAGTGCAGACTCAAGAAGAC	qRT-PCR	proRAD17-attB2-R	agaaagctgggtTTGAATTTCCCTTTGCCGAAA	Cloning
AiRAD17-qRT-R	GCCTGATTTGTCAACCCAC	qRT-PCR	proPARP2-2k-attB1-F	aaaaagcaggctcGGTTGGATTCTCGAGATA	Cloning
AiPARP2-qRT-F	AGCCTGAAGGCCCGGGTAACA	qRT-PCR	proPARP2-attB2-R	agaaagctgggtTTTCGCTTCTTCTCAGGAC	Cloning
AiPARP2-qRT-R	GCTGTCTCAGTTTTGGTGC	qRT-PCR	AiRAD51_SBMm_F	CAAAACGTAATCGAGATccaTTGAAaggaCCTT	Mutagenesis
OXI1-qRT-F	CCGGGACAGAATCTCAATTC	qRT-PCR	AiRAD51_SBMm_R	TCTCGATTACGTTTGGGTGAGCTTTTCTC	Mutagenesis
OXI1-qRT-R	GGATCATCACATTGTCTGCG	qRT-PCR			

第 1 章の ChIP-PCR、定量 RT-PCR、ジェノタイピング、クローニング、点変異導入実験で使用したプライマー配列を示す。

表 2. AlphaScreen で用いた合成オリゴ一覧

オリゴ名	配列 (5'→3')	関連する図表
AtRAD51_-171..-142_F	TAATCGAGACTTGTGAAGAAGCCTTTGCC	図12、図13、図14
AtRAD51_-171..-142_R	GGCAAAGGCTTCTTCAACAAGTCTCGATTA	図12、図13、図14
AtRAD51_-1160..-1131_F	CAATAAGGGTCCATAGCTCAGTGATAGAGC	図12、図13、図14
AtRAD51_-1160..-1131_R	GCTCTATCACTGAGCTATGGACCCTTATTG	図12、図13、図14
AtRAD51_-171..-142_F_m1	TAATCGAA A ACTTGTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m1	GGCAAAGGCTTCTTCAACAAGT T TCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m2	TAATCGAG G CTTGTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m2	GGCAAAGGCTTCTTCAACAAG C CTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m3	TAATCGAGAT T TGTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m3	GGCAAAGGCTTCTTCAACA A TCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m4	TAATCGAGAC C TGTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m4	GGCAAAGGCTTCTTCAACA G TCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m5	TAATCGAGACT C GTTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m5	GGCAAAGGCTTCTTCAAC G AGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m6	TAATCGAGACT A TTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m6	GGCAAAGGCTTCTTCA A TAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m7	TAATCGAGACT G CTGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m7	GGCAAAGGCTTCTTCA G CAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m8	TAATCGAGACT T CGAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m8	GGCAAAGGCTTCTT C GACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m9	TAATCGAGACT T TAAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m9	GGCAAAGGCTTCT T AACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m10	TAATCGAGACT G TTGAGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m10	GGCAAAGGCTTCT C CAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m11	TAATCGAGACT G TTGAGGAAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m11	GGCAAAGGCTTCT C TCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m12	TAATCGAGACT G TTGAA A AAGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m12	GGCAAAGGCTT T TCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m13	TAATCGAGACT G TTGAAG G AGCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m13	GGCAAAGGCT C TTCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m14	TAATCGAGACT G TTGAAGA G GCCTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m14	GGCAAAGG C TCTTCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m15	TAATCGAGACT G TTGAAGAA C CTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m15	GGCAAAG G TTTCTTCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m16	TAATCGAGACT G TTGAAGAAG T CTTTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m16	GGCAAAG A CTTCTTCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_m17	TAATCGAGACT G TTGAAGAAG T TTGCC	図12 D
AtRAD51_-171..-142_R_m17	GGCAA A AGCTTCTTCAACAAGTCTCGATTA	図12 D
AtRAD51_-171..-142_F_Left_3nt	TAATCGAGAT C CGTTGAAGAAGCCTTTGCC	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_R_Left_3nt	GGCAAAGGCTTCTTCAAC G GATCTCGATTA	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_F_Right_3nt	TAATCGAGACT G TTGAAG G GA C CTTTGCC	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_R_Right_3nt	GGCAAAG G T C CCTTCAACAAGTCTCGATTA	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_F_Double_3nt	TAATCGAGAT C CGTTGAAG G GA C CTTTGCC	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_R_Double_3nt	GGCAAAG G T C CCTTCAAC G GATCTCGATTA	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_F_Double_3A	TAATCGAGA A AGTTGAAG A AA C CTTTGCC	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_R_Double_3A	GGCAAAG T TTCTTCAAC T TTCTCGATTA	図14 A、B
AtRAD51_-171..-142_F_del	TAATCGAGACT G TGAGAAGCCTTTGCC	図14 A、C
AtRAD51_-171..-142_R_del	GGCAAAGGCTTCTACAAGTCTCGATTA	図14 A、C
AtBRCA1_-132..-103_F	TCTGTAAAGCTTTCAAGGGAAGCCTTTTG	図13
AtBRCA1_-132..-103_R	CAAAGAGGCTTCCCTTGAAAGCTTTACAGA	図13

図 12、13、14 で用いた合成オリゴの配列。変異を導入した塩基を赤色で示す。

1-3. 結果

SOG1 標的遺伝子の同定

SOG1 が DNA 損傷応答をどのように統御しているかを明らかにするために、まずシロイヌナズナの SOG1 の標的遺伝子を網羅的に同定することを試みた。はじめに、SOG1 依存的に発現変化する遺伝子を明らかにするために、Agilent カスタムマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。野生型植物および *sog1-1* 機能欠損変異体に DNA 二本鎖切断を引き起こす薬剤であるゼオシン (Chankova *et al.*, 2007) を 2 時間処理し、RNA を抽出後、マイクロアレイ解析を理化学研究所の関原明博士との共同研究として行った。マイクロアレイ実験は独立して 2 回行われ、それぞれの結果において、ゼオシン未処理に比べて処理後に 2 倍以上発現変動した 442 個の遺伝子を発現変動遺伝子とした。その内、野生型植物では、ゼオシンに反応して 342 個 (77%) の遺伝子の発現が 2 倍以上増加し、100 個 (23%) の遺伝子が 1/2 以下に低下した。興味深いことに、野生型植物で発現が増加した 342 個の遺伝子のうち、332 個の遺伝子は *sog1-1* においてゼオシン処理後に誘導されなかった。一方、野生型で発現低下した 100 個の遺伝子の中に、*sog1-1* で発現が変化した遺伝子は一つもなかった。したがって、SOG1 の下流では、合わせて 432 個の遺伝子 (SOG1 依存的に発現誘導される 332 個と発現抑制される 100 個の遺伝子) が発現制御されることが明らかとなった (表 3) (図 5)。また、以前の報告と同様に (Yoshiyama *et al.*, 2009)、DNA 損傷により発現誘導される多くの遺伝子が、SOG1 により制御されることも明らかとなった。

さらに、当研究室では、SOG1 が結合するゲノム領域を明らかにするために、ChIP-sequence (ChIP-Seq) が現在までに行われている。SOG1 の結合領域は、SOG1-Myc 融合タンパク質を *SOG1* プロモーターで発現させた植物 (*ProSOG1:SOG1-Myc*) を用いて、抗 Myc 抗体により免疫沈降し、SOG1-Myc が結合する DNA 断片を次世代シーケンサーで読むことにより同定された。その結果、ChIP-Seq により得られたシグナルのピークが 778 箇所同定され、その上流および下流 5kb 以内に、1514 遺伝子の転写開始点が含まれていることが明らかになった (図 5)。

次に、SOG1 によって直接転写制御される遺伝子を明らかにするために、SOG1 を介してゼオシン処理に反応する 432 個の遺伝子と ChIP-Seq により得られた 1514 個の候補遺伝子を重ね合わせたところ、146 個の SOG1 標的候補遺伝子が同定された (表 4) (図 5)。これら遺伝子の中には、すでに SOG1 の直接の標的遺伝子であることが報告されている、*SMR5* や *SMR7*、*FMO1*、*CYCBI;1* も含まれていた (Yi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Weimer *et al.*, 2016)。そして、マイクロアレイ解析の結果から、これら 146

遺伝子はすべて SOG1 により転写誘導されると考えられることから (表 4)、SOG1 は転写活性化因子 (activator) として働くことが示唆された。

次に、得られた 146 個の標的候補遺伝子が SOG1 により直接転写制御されているかどうか確認するために、初めに、DNA 損傷応答のマーカー遺伝子として用いられる *AtRAD51* および *AtBRCA1* について、ChIP-PCR および定量 RT-PCR により検証した。ChIP-Seq の時と同様に、ゼオシンを 2 時間処理した、または未処理の *ProSOG1:SOG1-Myc* 植物からゲノム DNA を抽出し断片化した後、抗 Myc 抗体により免疫沈降し、SOG1-Myc が結合する DNA 断片を得た。この時、免疫沈降前の DNA 断片を input とし、抗体抗原反応のネガティブコントロールとして野生型植物を用いた。各遺伝子の ChIP-Seq のシグナルピークの位置を含む領域を検出するプライマー (P2)、および、その位置から約 1 kb 上流または下流の領域を検出するプライマー (P1 および P3)、そして SOG1 の結合に関するネガティブコントロールとして *Mu-like transposon (Mul)* を検出するプライマーを用いて、得られた DNA 断片サンプルに対して定量 PCR を行った。% input を算出し、ネガティブコントロール (野生型植物) と比較することによって SOG1 の結合能を評価したところ、SOG1 の結合はゼオシン処理した *ProSOG1:SOG1-Myc* 植物において、*AtRAD51* の P2、P3、および、*AtBRCA1* の P1、P2、P3 で認められた (図 6 A、B)。特に、ChIP-Seq のシグナルピークの位置と相関して、SOG1 の結合能は P2 で最も高かった。興味深いことに、これらの SOG1 の結合はゼオシン未処理の時には見られなかった (図 6 A、B)。続いて、マイクロアレイの時と同様に、ゼオシンを 2 時間処理した、または未処理の野生型および *sog1-1* から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。その結果、*AtRAD51* および *AtBRCA1* の遺伝子発現はゼオシンに応答して誘導されていた。一方で、その発現誘導は、*sog1-1* では見られなかった (図 6 C)。以上の結果から、*AtRAD51* および *AtBRCA1* は SOG1 の直接の標的であることが示された。加えて、無作為に選んだ 15 個の標的候補遺伝子についても SOG1 の直接の標的であるかどうかを検討した。上で示した通り、ChIP-Seq のシグナルピークの位置周辺で SOG1 の結合能が最も高かったことから、今回は ChIP-Seq のシグナルピークの位置を含む領域を検出するプライマー (P2) のみを用いて、ChIP-PCR を行った。その結果、*AtRAD51* や *AtBRCA1* と同様に、SOG1 はゼオシン処理依存的に、調べたすべての遺伝子のゲノム領域に結合することが明らかとなった (図 7 A)。さらに、定量 RT-PCR についても同様に行ったところ、無作為に選んだ 15 個の遺伝子の発現はゼオシン処理に依存的に SOG1 依存的に誘導されることが確認された (図 7 B)。これらの結果から、同定した 146 遺伝子は SOG1 の標的遺伝子であることが示唆された。そして、DNA 損傷シグナルが SOG1 の標的 DNA 配列への結合に必要であることが示唆された。

SOG1 は DNA 損傷応答に加え他のストレス応答に関わる遺伝子も直接制御する

SOG1 の標的遺伝子群がどのような機能を持っているのか明らかにするために、植物の遺伝子解析に特化した Gene ontology (GO) 解析プログラム「AgriGO」(Du *et al.*, 2010) を用いて GO 解析を行った。その結果、「cell cycle」($p = 3.7 \times 10^{-6}$) や「DNA repair」($p = 4.3 \times 10^{-15}$) など、DNA 損傷応答に関わる GO タームに、SOG1 の標的遺伝子群が多く含まれることを明らかにした (表 5)。これらの結果から、SOG1 は DNA 損傷に応答し、標的遺伝子の転写を誘導することで、細胞周期進行制御や DNA 修復を直接制御していることが示唆された。

さらに、SOG1 の標的遺伝子群で多くの遺伝子が属していた、「response to stimulus」($p = 2.6 \times 10^{-7}$) の GO カテゴリーについて注目して調べたところ、DNA 損傷応答関連の「response to DNA damage stimulus」($p = 3.7 \times 10^{-15}$)、「response to gamma radiation」($p = 2.0 \times 10^{-14}$) に加え、非生物ストレス応答に関連する GO ターム(「response to water deprivation」($p = 1.4 \times 10^{-3}$)、「response to wounding」($p = 8.1 \times 10^{-3}$)、等) が有意に濃縮することが示された (図 8 A)。そこで、SOG1 標的遺伝子の発現が、非生物ストレスによっても影響を受けるか明らかにするために、公開されているマイクロアレイデータ (AtGenExpress) からデータセットを取得し、SOG1 標的遺伝子の発現プロファイルを分析した。クラスタリング解析には 146 個の SOG1 標的遺伝子のうち、AtGenExpress で使用されたアフィメトリクス社製のジーンチップ Affymetrix GeneChip ATH1 Genome Array (25K) に搭載されている 118 遺伝子に対して解析を行った。はじめに、ブレオマイシン (bleomycin : BLM) およびマイトマイシン C 処理 (mitomycin C : MMC) による DNA 損傷に加え、低温、乾燥、熱、浸透圧、酸化、塩、傷害といった非生物ストレスに関するデータセットの比較を行ったところ、SOG1 標的遺伝子の 80%以上の遺伝子 (97/118) の発現が、DNA 二本鎖切断を引き起こすブレオマイシンおよびマイトマイシン C 処理によって2倍以上増加することがわかった (図 8 B)。さらに、約 25%の SOG1 標的遺伝子 (118 遺伝子中 30 遺伝子) がその他の非生物ストレスにおいて発現誘導されることが確認された (図 8 B)。Missirian ら (2014) も同様に、DNA 二本鎖切断を引き起こす γ 線照射や HZE 照射 (high-Z high-energy particle radiation) によって発現誘導される遺伝子の一部が幅広い非生物ストレスに応答することを報告している。しかし、これらの発現変化はストレス処理後、遅い段階で見られることから、ストレス応答の副次的な影響であるとされていた。一方で、SOG1 標的遺伝子に関しては、ストレス処理から初期に発現誘導される遺伝子も存在していた (図 8 B)。実際、SOG1 標的遺伝子には、塩や乾燥、熱ストレスの初期応答遺伝子である *DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN 19* (*DREB19*) (Krishnaswamy *et al.*, 2011) や、乾燥および熱ストレスの初期応答遺伝子

NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1-LIKE 4 (NLT4) (Lee *et al.*, 2012)、そして低温や塩、乾燥ストレスの初期応答遺伝子 *EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14 (ERD14)* (Kiyosue *et al.*, 1994) が含まれている (表 4)。したがって、少なくとも一部の SOG1 標的遺伝子は DNA 損傷以外の非生物ストレスのシグナル系に制御される遺伝子であることが考えられる。また、「response to stimulus」の GO カテゴリーには、生物ストレス応答に関する GO ターム (「response to fungus」 ($p = 1.1 \times 10^{-3}$)、「immune effector process」 ($p = 2.9 \times 10^{-3}$)、等) も存在することがわかった (図 8 A)。実際、免疫応答関連遺伝子で知られている *SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 (SAG101)* (Feys *et al.*, 2005) や *OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 (OXI1)* (Rentel *et al.*, 2004)、*AtMYB44* (Shim *et al.*, 2013)、*WRKY50* (Gao *et al.*, 2011)、*FMO1* (Mishina and Zeier, 2006)、等は SOG1 標的遺伝子である (表 4)。最近の研究では、病原細菌や真菌、卵菌が感染した宿主細胞や、免疫応答の一つとして蓄積されるサリチル酸が高いレベルで宿主細胞に存在する時に、宿主ゲノムに DNA 損傷が引き起こされることが知られている (Yan *et al.*, 2013; Song and Bent, 2014)。さらに、クラスター解析の結果から、約 27% の SOG1 標的遺伝子 (118 遺伝子中 32 遺伝子) の発現が病原細菌 *Pst* DC3000 や *Pst AvrRpt2*、病原真菌 *Botrytis cinerea* の感染に加え、免疫応答系を活性化させるエリシター (lipopolysaccharide (LPS)、flagellin peptide (22 amino acids) (Flag22)、harpin protein HrpZ (HrpZ)、necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1 (NPP1)) に応答して誘導されることが明らかとなった (図 8 C)。以上のことから、SOG1 は病原菌感染に応答して活性化し、免疫応答を制御している可能性が考えられた。

SOG1 および p53 標的遺伝子の比較

SOG1 と p53 はアミノ酸配列が全く異なるが、植物または動物の DNA 損傷に対する転写応答の中心的役割を果たしているため (Yoshiyama *et al.*, 2014)、両者の機能的な類似性や独自性を検討するために、それぞれの標的遺伝子に濃縮される GO カテゴリーを比較検討した。p53 ノックアウトマウスの胎仔線維芽細胞を用いた研究により、p53 は、DNA 二本鎖切断を引き起こすドキシソルビシン処理に応答して、432 個の遺伝子を直接転写制御することが明らかになっている (Kenzelmann Broz *et al.*, 2013)。そして、432 遺伝子のうち、365 遺伝子が活性化、67 遺伝子が抑制化されることが調べられている。様々な生物種の遺伝子のアノテーション情報を取り扱うことが可能な GO 解析プログラム「BiNGO (ver. 3.03)」(Maere *et al.*, 2005) を用いて、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) またはマウス (*Mus musculus*) の全遺伝子に比べて SOG1 または p53 の標的遺伝子に有意に濃縮される GO タームを Cytoscape プラットフォームで視覚化した (図 9)。濃縮されている GO タームを比較解析したところ、SOG1 と

p53 が制御する遺伝子のカテゴリーは細胞周期やチェックポイント、非生物ストレスに対する応答といった同じものが多かった。特に、「cell cycle」(SOG1 標的遺伝子が $p = 1.4 \times 10^{-7}$ 、p53 標的遺伝子が $p = 1.6 \times 10^{-7}$) や「cell cycle arrest」(SOG1 標的遺伝子が $p = 7.2 \times 10^{-3}$ 、p53 標的遺伝子が 3.0×10^{-6}) などの細胞周期制御に関わる GO タームがそれぞれの標的遺伝子で大きな比率を占めていた (表 6、7)。実際、SOG1 は CDK 阻害因子である *SMR4* や *SMR5*、*SMR7*、*KIP-RELATED PROTEIN 6 (KRP6)* を直接誘導する一方で、p53 は同じく CDK 阻害因子 p21^{Cip/Waf} をコードする *CDKN1A* を標的とすることから (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993)、植物および動物の DNA 損傷応答において、SOG1 および p53 が細胞周期チェックポイントの制御因子として重要な役割を担っていることが示唆された。一方で、SOG1 もしくは p53 標的遺伝子でのみ有意に濃縮される GO タームも明らかになった。例えば、DNA 修復に関連する GO タームは、SOG1 標的遺伝子でのみ濃縮されていた (「DNA repair」、 $p = 2.9 \times 10^{-16}$; 「double-strand break repair」、 $p = 2.4 \times 10^{-8}$) (表 6)。SOG1 は相同組換えに関わる多くの遺伝子 (*AtRAD51*、*AtBRCA1*、*AtRAD17*、*AtRPAs*、*AtCtIP*、等) を直接の標的としており、「double-strand break repair via homologous recombination」の GO タームが SOG1 標的遺伝子の中で大きい比率を占めていたことから ($p = 1.9 \times 10^{-3}$)、SOG1 は相同組換えを誘導する役割を担っている可能性が示唆された。一方で、アポトーシス関連の GO タームが p53 の標的遺伝子でのみ濃縮されていたことから (「apoptotic process」、 $p = 7.8 \times 10^{-10}$ 、「apoptotic signaling pathway」、 $p = 5.7 \times 10^{-8}$)、p53 はアポトーシスによる細胞死に関与していることが示唆された (表 7)。

SOG1 のリン酸化は標的配列への結合に必須である

上で示した通り、SOG1 は DNA 損傷を与えた際に、標的遺伝子のプロモーター領域に結合する (図 6 A、B、図 7 A)。これまでに、ATM は SOG1 の C 末端領域に存在する 5 箇所の SQ モチーフをリン酸化し、SOG1 を活性化することが明らかになっているため (Yoshiyama *et al.*, 2013; Yoshiyama *et al.*, 2017)、DNA 損傷に応答した SOG1 のリン酸化が、標的ゲノム領域への結合に必要なか調べた。5 つの SQ モチーフに含まれるセリンを全てアラニンに置換した変異型 SOG1 (5A) を非リン酸化型 SOG1 として (Yoshiyama *et al.*, 2013)、*sog1-1* 植物背景で、SOG-Myc または SOG1(5A)-Myc 融合タンパク質を *SOG1* プロモーター下で発現する植物 (*sog1-1 ProSOG1:SOG1-Myc* および *sog1-1 ProSOG1:SOG1(5A)-Myc*) にゼオシンを処理し、ChIP-PCR 解析を行った。その結果、SOG1-Myc は有意に *SMR7*、*AtRAD51*、*AtBRCA1* プロモーターに結合したことに對し、SOG1(5A)-Myc では結合が検出されなかった (図 10)。この結果から、SOG1 のリン酸化が標的 DNA への結合に必要なことが考えられた。

SOG1 は CTT(N)₇AAG 配列に結合する

次に、SOG1 が結合するコンセンサス配列の同定を行った。はじめに、ChIP-Seq 解析より得られた、SOG1 の結合部位を示すシグナルピークの位置を調べたところ、これらのシグナルピークの約 50%は、転写開始点から上流 1 kb 以内のプロモーター領域に位置し、36%は転写開始点から下流 1 kb 以内に存在していた (図 11 A)。次に、SOG1 が結合するコンセンサス配列を得るため、146 個の SOG1 標的遺伝子の転写開始点から上流 1 kb の DNA 配列情報を抽出し、モチーフ検索ツールを用いて解析を行った。初めに、連続した塩基配列で構成されるモチーフを検索するプログラム「MEME」(Bailey *et al.*, 2006) を用いたところ、解析した DNA 配列情報からコンセンサスな配列が得られなかった。次に、スペーサー配列を挟んだ 2 つの 3 塩基で構成されるモチーフを検索することが可能な「RSAT-spaced dyad tool」(Helden *et al.*, 2000) を用いた結果、7 塩基のスペーサーを含むパリンδροミックな配列 CTT(N)₇AAG が、SOG1 の結合配列の候補として同定された (図 11 B)。

続いて、SOG1 が実際に CTT(N)₇AAG 配列に結合するか調べるために、AlphaScreen システムを用いて、SOG1 タンパク質と合成二本鎖 DNA との結合を調べた (岐阜大学、山本義治教授との共同研究)。AlphaScreen とは、二分子間の相互作用を定量するために開発された手法で、二種類のビーズに補足された分子同士が結合すると、二種類のビーズが近接することに伴って発生する化学発光度を測定するシステムである (図 12 A) (Tokizawa *et al.*, 2015)。SOG1 の標的遺伝子の一つである *AtRAD51* のプロモーターには、CTT(N)₇AAG 配列が転写開始点から上流の -80 bp から -51 bp に位置している (図 12 B)。そこで、CTT(N)₇AAG 配列を含む二本鎖 DNA (Region A) を合成して SOG1 との結合を解析した。*AtRAD51* のプロモーターの転写開始点から上流 -1069 bp から -1040 bp の CTT(N)₇AAG 配列を含まない DNA 配列 (Region B) をネガティブコントロールとして用いたところ、SOG1 タンパク質は Region A に対して結合によるシグナルが有意に高かった (図 12 C)。得られたシグナルが SOG1 タンパク質の二本鎖 DNA への特異的な結合によるものか調べるため、ビオチンラベルをしていない二本鎖 DNA を反応に加える競合試験を行った。ビオチンラベルをしていない二本鎖 DNA が存在しない時 (absence of competitor: AC) のシグナル強度を 1 とすると、Region A を競合二本鎖 DNA として反応に加えた場合、その相対シグナル強度は著しく低下した。一方、Region B を競合二本鎖 DNA として用いた場合では、変化が見られなかった (図 12 D; Region A, Region B)。以上の結果から、SOG1 は CTT(N)₇AAG 配列を含む Region A に特異的に結合することが示された。

次に、CTT(N)₇AAG 配列のどの塩基が SOG1 の結合に必須であるかを調べるために、点変異を加えた競合二本鎖 DNA を設計した。モチーフ検索の結果から CTT(N)₇AAG

配列の CTT からさらに上流 2 塩基 (AG) と AAG からさらに下流 2 塩基 (CT) のスコアもやや高かったことから (図 11 B)、これらを含めた計 17 塩基を解析の対象にした。この 17 塩基のうち最も上流側に位置する A に変異を導入した競合二本鎖 DNA を m1 と名付け、下流側へ順に一塩基のみを置換した競合二本鎖 DNA を設計し、m1 から m17 までの競合二本鎖 DNA を作製した (図 12 D、表 2)。これらの競合二本鎖 DNA を用いた競合試験の結果、m3、m4、m5、m12、m13、m14、m15 を用いた場合に、SOG1 の Region A への結合に対する競合能が有意に失われることが明らかになった (図 12 D)。よって、m3、m4、m5、m12、m13、m14、m15 で変異が導入された 7 塩基が SOG1 の Region A への結合に重要であることが示唆され、上で同定した SOG1 のコンセンサス配列とよく一致することが明らかになった。

さらに、SOG1 が CTT(N)₇AAG 配列を介して *AtRAD51* 以外の SOG1 標的遺伝子のプロモーターにも結合するかを検証するため、SOG1 標的遺伝子の一つである *AtBRCA1* プロモーターの配列を用いて競合試験を行った。*AtBRCA1* プロモーターには転写開始点から上流-36 から-7 の領域に CTT(N)₇AAG 配列が存在することから (図 13 A)、この領域を競合二本鎖 DNA として用いたところ、SOG1 と Region A との結合は著しく阻害された (図 13 B)。以上の結果から、SOG1 は CTT(N)₇AAG 配列を含む *AtBRCA1* プロモーターにも結合することが明らかとなった。さらに、CTT(N)₇AAG の CTT または AAG のどちらか、もしくは両方を SOG1 が認識して結合しているのか調べた。初めに、CTT または AAG のどちらか一方を TCC または GGA に置換した二本鎖 DNA を用いて競合試験を行ったところ、Region A による競合能は部分的に抑制された (図 14 A、B ; Left_3nt、Right_3nt)。そして、両方の CTT および AAG を置換した二本鎖 DNA を用いて競合試験を行ったところ、競合能は完全に失われる結果となった (図 14 A、B ; Dobule_3nt)。さらに両方の CTT および AAG を他の配列 (AAA) に置換した場合にも、同様の結果であったことから (図 14 A、B ; Dobule_3A)、CTT および AAG の両方の塩基が SOG1 の結合に必要であることが考えられた。次に、CTT および AAG の間の 7 塩基の物理的な距離が、SOG1 の結合に重要であるか検証するため、CTT および AAG の間の 3 塩基を除いた二本鎖 DNA を用いて競合試験を行った。その結果、Region A による競合能は部分的に抑制された (図 14 A、C ; del)。この結果から、CTT と AAG の間の適切な距離が SOG1 の結合に重要であることが示唆された。

さらに、CTT(N)₇AAG の配列が、シロイヌナズナの全遺伝子のプロモーター領域と比較して、SOG1 標的遺伝子のプロモーターに有意に濃縮されているか調べた。はじめに、シロイヌナズナの全遺伝子の TSS から上流 1 kb のプロモーター配列に対して CTT(N)₇AAG の出現頻度を調べたところ、転写開始点からの距離に関係なく、全体の 4 %前後の頻度を示した。一方で、SOG1 標的遺伝子のプロモーターに対して

CTT(N)₇AAG の出現頻度を調べたところ、転写開始点から-400 bp 以内の位置に 8～15 %の頻度で存在し、シロイヌナズナの全遺伝子と比較して有意に濃縮されていることが明らかになった (図 11 C)。さらに、146 個の SOG1 標的遺伝子のプロモーターに CTT(N)₇AAG の配列が存在するか調べたところ、全体の 51%にあたる 74 個の SOG1 標的遺伝子が、単一のまたは複数の CTT(N)₇AAG の配列を転写開始点から上流 1 kb 以内に持っていることが明らかとなった (図 15)。残りの 72 個の SOG1 標的遺伝子は、CTT(N)₇AAG の配列が転写開始点から上流 1 kb 以降に存在するか、もしくはプロモーター上に存在しなかった。

CTT(N)₇AAG 配列は DNA 損傷による *AtRAD51* の発現誘導に必要である

植物細胞内で、SOG1 が CTT(N)₇AAG 配列を介して標的遺伝子の発現誘導を行うかどうかを調べるため、一過性発現実験系を確立した。はじめに、*AtRAD51* プロモーターを用いて解析するために、*AtRAD51* プロモーターの上流 2 kb を *βLUC* 遺伝子と融合させたレポーターコンストラクトを構築し、リファレンスコンストラクトと共に野生型植物と *sog1-1* の本葉から単離したプロトプラストに導入した。その結果、野生型植物由来のプロトプラストにおけるルシフェラーゼ活性は *sog1-1* 由来のプロトプラストにおける活性よりも、4 倍近く高かったことから、野生型植物由来のプロトプラストでは、DNA 損傷の処理なしに内在性の SOG1 が既に活性化状態にあることが示唆された (図 16 A)。その理由としては、植物細胞がプロトプラスト化する過程において、酵素による細胞壁分解が DNA 損傷を引き起こし、SOG1 を活性化した可能性が考えられる。次に、レポーターコンストラクトに加えてエフェクターコンストラクト *35S:SOG1* を *sog1-1* 由来のプロトプラストに導入し、15 μM ゼオシン含むまたは含まない培地で 2 時間処理した後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ゼオシンを処理していないプロトプラストでは SOG1 の一過性発現によって *AtRAD51* プロモーター活性が上昇し、その活性の値はゼオシンを処理したプロトプラストの場合と同程度であった (図 16 B)。さらに、SOG1 の代わりに非リン酸化型の SOG1(5A)を一過性発現させた際には *AtRAD51* プロモーターの活性化が全く観察されなかった (図 16 C)。したがって、プロトプラストを用いた一過性発現系における *AtRAD51* プロモーターの活性化は、DNA 損傷依存的な SOG1 のリン酸化を介して制御されている (Yoshiyama *et al.*, 2013)。一方で、*AtRAD51* プロモーター内の CTT(N)₇AAG 配列に変異を導入したところ (5'-GACTTGTGAAGAAGCC-3' から 5'-GATCCATTGAAAGGACC-3')、*AtRAD51* プロモーターの活性化は引き起こされなかった (図 16 C)。これらの結果から、SOG1 は CTT(N)₇AAG を介して *AtRAD51* の発現を直接誘導することが明らかとなった。

さらに、植物体において、CTT(N)₇AAG 配列が SOG1 標的遺伝子の発現誘導に必須であるか明らかにするため、*AtRAD51* プロモーターを *GUS* 遺伝子と融合させた形質転換体を作製して、DNA 損傷存在下での *GUS* 発現を調べた。野生型の *AtRAD51* プロモーターでは、通常条件では根端において *GUS* 発現が観察されないが、ゼオシンを処理することにより発現が急激に上昇した。また *sog1-1* 変異体背景では、ゼオシン存在下にも関わらず、*AtRAD51* プロモーターによる *GUS* 遺伝子の発現誘導が認められなかった。そして、*AtRAD51* プロモーターの CTT(N)₇AAG に変異を導入した植物では、*sog1-1* 変異体背景と同様に、ゼオシン処理による *GUS* 遺伝子の発現誘導は観察されなかった(図 17)。以上の結果により、CTT(N)₇AAG 配列は植物体においても DNA 損傷に応答した SOG1 標的遺伝子の発現誘導に必須であることが示唆された。

NAC 型転写因子 ANAC001 や ANAC019、VOZ2 は、ホモ複合体を形成することで、スペーサーを含むパリンドロミックな DNA 配列に結合することが知られている (Xie *et al.*, 2000; Mitsuda *et al.*, 2004; Ernst *et al.*, 2004)。SOG1 も同様にスペーサーを含むパリンドロミックな DNA 配列を認識することから、ホモ複合体を形成することで、DNA に結合する可能性が考えられる。そこで、SOG1 同士がタンパク質間相互作用するかどうかを調べるために、BiFC アッセイを行った。野生型植物の本葉から単離したプロトプラストに、Venus の N 末端側 (Venus (N)) または C 末端側 (Venus (C)) を SOG1 もしくは GUS (ネガティブコントロール) と融合したタンパク質を一過的に発現させた。GUS および SOG1 を発現させたバックグラウンドのシグナルと比較すると、SOG1 同士を発現させた場合には、細胞核と予想される場所で Venus タンパク質の蛍光が観察された (図 18)。興味深いことに、非リン酸化型の SOG1 (SOG1(5A)) 同士では Venus の蛍光が観察されなかった (図 18)。プロトプラスト内では DNA 損傷シグナル系が活性化状態にあることを考慮すると (図 17)、SOG1 はおそらくリン酸化されることにより、ホモ複合体を形成する可能性が考えられる。

SOG1 は病原真菌 *C. higginsianum* に対する抵抗性の獲得に寄与する

上述の GO 解析の結果から、「response to chitin」 ($p = 2.0 \times 10^{-6}$) や「immune effector process」 ($p = 2.9 \times 10^{-3}$)、「response to fungus」 ($p = 1.1 \times 10^{-3}$) など、植物免疫応答に関わる GO タームが、SOG1 標的遺伝子群で有意に濃縮されていることが明らかになった (図 8 A)。さらに、SOG1 標的遺伝子の中には、植物免疫に関わることが報告されている複数の遺伝子が含まれていることも示された (表 4)。また、最近の研究で、細菌や真菌、卵菌といった病原菌が植物に感染することで、宿主のゲノム DNA に損傷が引き起こされることが報告されている (Song and Bent, 2014)。さらに、病原菌が感染すると、防御応答として蓄積する植物ホルモンのサリチル酸が DNA 損傷を引き起

こすことも明らかにされている (Yan *et al.*, 2013)。これらの結果から、病原菌感染と DNA 損傷との関連性が予想され、SOG1 が病原菌に対する防御応答に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、病原菌に対する罹病性を、野生型と *sog1* 変異体で比較することにより、植物免疫応答における SOG1 の役割を検証した。

はじめに、病原細菌 *Pst* DC3000 に対する感受性試験を行った。サリチル酸シグナル系の活性化に欠損がある *pad4-1* 変異体は、*Pst* DC3000 に対して高い罹病性を示すことが報告されていることから (Jirage *et al.*, 1999)、実験上のコントロール植物として用いた。短日条件で育てた 5 週齢のシロイヌナズナの本葉に *Pst* DC3000 をシリンジにより浸潤させ、感染から 3 日後に単位面積あたりの細菌数を計測した結果、野生型では 1 cm² あたり細菌数の平均が 10^{4.0} 個であることに對し、*pad4-1* は、10⁷ 個を超えており、過去の報告と同様に (Feys *et al.*, 2001; Feys *et al.*, 2005)、野生型よりも高い罹病性を示した。一方、*sog1-1* は 1 cm² あたり細菌数の平均が 10^{4.4} 個と野生型との間には有意な差が見られなかった (図 19)。さらに、他の *sog1* 変異体アリルである *sog1-7* (Sjogren *et al.*, 2015)、および、新規に単離した T-DNA 挿入変異体である *sog1-101* (GABI_602B10) についても同様の実験を行った。*sog1-101* は、T-DNA が 3 番目のイントロンに挿入することで SOG1 遺伝子の転写が欠損している変異体で (図 20 A、B)、*sog1-1* と同様に、ゼオシンに応答した SOG1 標的遺伝子 (*AtRAD51* および *AtBRCA1*) の発現誘導が見られず (図 20 C)、根の伸長においても *sog1-1* と同様にゼオシンに対して低感受性を示した、(図 20 D)。*Pst* DC3000 に対する感受性についても、*sog1-7* および *sog1-101* は感染 3 日後の 1 cm² あたり細菌数の平均がそれぞれ 10^{4.7} 個および 10^{3.9} 個であり、*sog1-1* と同様に、野生型と同程度であった (図 19)。

続いて、*avrPphB* エフェクターを分泌する *Pst avrPphB* に対する罹病性を調べた。*avrPphB* はシステインプロテアーゼであり、宿主細胞に分泌された後、MTI のシグナル系に関わるタンパク質を切断し、免疫応答を抑制する (Dou and Zhou, 2012)。一方、植物側も *avrPphB* に対する応答機構を備えており、その活性化に RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE5 (RPS5) が必須であることが知られている (Beth Mudgett, 2005)。*Pst avrPphB* を植物に感染したところ、*sog1-1* は野生型よりも非常に高い罹病性を示した (図 21 A)。しかし、*sog1-101* の *Pst avrPphB* に対する罹病性は野生型と同程度であった (図 21 A)。そこで、*sog1-1* と *sog1-101* での *Pst avrPphB* に対する罹病性の違いをもたらす要因を明らかにするために、*sog1-1* を用いたマイクロアレイ解析の結果を調べたところ、*sog1-1* では RPS5 遺伝子の転写が欠損していた。さらに、定量 RT-PCR を行ったところ、*sog1-1* では RPS5 遺伝子の発現が検出されなかった (図 21 B)。そこで、*sog1-1* の RPS5 遺伝子のゲノム領域を調べたところ、RPS5 遺伝子を含む領域が *sog1-1* で完全に欠損しているとともに、その領域に *Tag2* トランスポゾンが挿入していた (図 21 C、D)。*sog1-1* は、*Ler-0* から単離された変異体であり、ゲノ

ム解析の結果から、*Ler-0* では *sog1-1* 変異体と同様に、*RPS5* 遺伝子を欠損するとともに、*Tag2* トランスポゾンが挿入していることが調べられている (Henk *et al.*, 1999)。このゲノム領域付近の DNA 配列を読み、*sog1-1* と *Ler-0* で比較したところ、配列が一致したことから、*sog1-1* は *Col-0* との戻し交配が不十分であったために、*Ler-0* 由来の *RPS5* のゲノム領域が残っていたのだと考えられる。このことから、*sog1-1* 変異体は *RPS5* 遺伝子を欠損しているために、*Pst avrPphB* に対して高い罹病性を示したことが示唆された。以上の結果から、*SOG1* は病原細菌 *Pst avrPphB* に対する抵抗性には関与しないことが考えられた。

次に、*SOG1* が病原真菌に対する抵抗性に関与するかどうかを調べるために、*C. higginsianum* に対する感受性試験を行った。*C. higginsianum* は半生体栄養性の真菌であり、シロイヌナズナを含む複数のアブラナ科に感染した後、感染組織に炭疽病斑を形成することが知られている (Perfect *et al.*, 1999; O'Connell *et al.*, 2012)。そこで、*C. higginsianum* の孢子懸濁液を、*sog1* 変異体および *pad4-1* に接種したところ、これらの変異体は野生型植物に比べて感染後 6 日目の病斑の面積が有意に大きくなった (図 22 A、B)。また、*pad4-1* は *sog1* 変異体よりもさらに大きい病斑面積の拡大が観察された (図 22 A、B)。

さらに、*C. higginsianum* が、野生型植物より *sog1* 変異体で感染しやすくなっているかを調べるために、接種後 5 日目、7 日目の *C. higginsianum* 由来の *ACT* (*ChACT*) 遺伝子の転写量を定量 RT-PCR により測定した。その結果、*sog1-101* では野生型植物と比べ、*ChACT* 遺伝子の転写が有意に増加していた (図 22 C)。これらの結果から、*sog1* 変異体は *C. higginsianum* が感染しやすくなっているとともに、病原真菌に対する防御応答に欠損があることが示唆された。最近の研究で、*SOG1* 標的遺伝子である DNA 修復関連遺伝子の *AtRAD51*、*AtRAD17*、*AtPARP1*、*AtPARP2* が病原菌に対する抵抗性に関与することが報告されている (Wang *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015)。そこで、*C. higginsianum* 接種後の *sog1-101* でのこれら遺伝子の転写量を測定したところ、*sog1-101* では野生型植物で見られる *AtRAD51*、*AtRAD17*、*AtPARP1*、*AtPARP2* 遺伝子の発現誘導は抑制されていた (図 23)。これらの結果から、病原菌が感染した際に *SOG1* は、これらの DNA 修復遺伝子をはじめ、病原菌の抵抗性に関わる遺伝子群の転写を誘導することで、病原真菌に対する防御応答に寄与している可能性が示唆された。

表 3. SOG1 制御遺伝子リスト (続き)

AGI code	gene symbol	fold change		log ₂ (FC)		AGI code	gene symbol	fold change		log ₂ (FC)	
		WT	sog1-1	WT	sog1-1			WT	sog1-1	WT	sog1-1
AT3G13235	AT3G13235	2.2	1.3	1.2	0.4	AT3G30665	AT3G30665	0.4	0.8	-1.4	-0.2
AT1G20120	AT1G20120	2.2	1.1	1.1	0.1	AT1G66390	PAP2	0.4	4.7	-1.4	2.2
AT1G41650	AT1G41650	2.2	0.3	1.1	-1.7	AT4G34550	AT4G34550	0.4	0.5	-1.4	-1.1
AT1G52920	GCR2/GPCR	2.2	1.0	1.1	0.0	AT1G38350	AT1G38350	0.4	0.8	-1.4	-0.3
AT2G07213	AT2G07213	2.2	1.0	1.1	0.0	AT1G34480	AT1G34480	0.4	0.8	-1.4	-0.4
AT1G68360	AT1G68360	2.2	1.1	1.1	0.1	AT4G04157	AT4G04157	0.4	1.3	-1.4	0.4
AT1G20350	ATTIM17-1	2.2	1.2	1.1	0.3	AT5G07260	AT5G07260	0.4	1.2	-1.4	0.3
AT5G06278	AT5G06278	2.2	0.8	1.1	-0.3	AT2G26630	AT2G26630	0.4	0.6	-1.4	-0.6
AT5G11410	AT5G11410	2.2	1.0	1.1	0.0	AT3G49570	AT3G49570	0.4	3.4	-1.4	1.7
AT5G56510	APUM12	2.2	0.9	1.1	-0.2	AT1G26973	AT1G26973	0.4	1.3	-1.4	0.4
AT2G02240	MEE66	2.2	1.1	1.1	0.1	AT2G31310	LBD14	0.4	0.8	-1.4	-0.4
AT5G02020	AT5G02020	2.2	1.2	1.1	0.3	AT2G27220	BLH5	0.4	1.3	-1.4	0.4
AT4G01460	AT4G01460	2.2	0.6	1.1	-0.6	AT5G45030	AT5G45030	0.4	0.7	-1.4	-0.5
AT3G43580	AT3G43580	2.1	1.0	1.1	0.0	AT1G19060	AT1G19060	0.4	1.0	-1.4	0.0
AT1G59590	ZCF37	2.1	1.3	1.1	0.4	AT2G05753	AT2G05753	0.4	1.0	-1.4	0.1
AT2G33790	AT2G33790	2.1	0.5	1.1	-0.9	AT3G13784	ATCWINV5	0.4	0.5	-1.5	-1.1
AT1G78110	AT1G78110	2.1	1.0	1.1	0.0	AT1G23120	AT1G23120	0.4	1.1	-1.5	0.1
AT5G20000	AT5G20000	2.1	1.3	1.1	0.3	AT3G13624	AT3G13624	0.4	1.0	-1.5	0.1
AT4G18340	AT4G18340	2.1	1.0	1.1	0.0	AT5G49130	AT5G49130	0.4	1.4	-1.5	0.5
AT5G04470	SIM	2.1	1.1	1.1	0.1	AT1G48060	AT1G48060	0.4	1.4	-1.5	0.5
AT2G19960	AT2G19960	2.1	0.8	1.1	-0.4	AT3G04903	AT3G04903	0.3	0.9	-1.5	-0.1
AT3G13380	BRL3	2.1	1.2	1.1	0.3	AT1G57480	AT1G57480	0.3	1.3	-1.5	0.4
AT2G34670	AT2G34670	2.1	1.1	1.1	0.1	AT5G26220	AT5G26220	0.3	5.9	-1.5	2.6
AT2G18760	CHR8	2.1	1.2	1.1	0.2	AT2G26211	AT2G26211	0.3	1.0	-1.6	0.0
AT5G05280	AT5G05280	2.1	0.7	1.1	-0.6	AT1G35745	AT1G35745	0.3	0.5	-1.6	-1.0
AT3G55700	AT3G55700	2.1	1.4	1.1	0.5	AT5G36960	AT5G36960	0.3	1.3	-1.6	0.3
AT1G48870	AT1G48870	2.1	1.0	1.1	0.0	AT3G49580	AT3G49580	0.3	5.0	-1.6	2.3
AT5G49520	WRKY48	2.1	1.3	1.0	0.4	AT1G66000	AT1G66000	0.3	1.0	-1.6	0.0
AT1G17310	AT1G17310	2.1	1.5	1.0	0.6	AT5G65070	MAF4	0.3	1.4	-1.6	0.5
AT3G51920	CAM9	2.0	1.3	1.0	0.4	AT2G10100	AT2G10100	0.3	1.2	-1.6	0.3
AT2G03870	AT2G03870	2.0	1.1	1.0	0.1	AT3G14440	NCED3	0.3	3.2	-1.6	1.7
AT1G20680	AT1G20680	2.0	0.6	1.0	-0.7	AT4G40100	AT4G40100	0.3	0.7	-1.6	-0.5
AT5G05650	AT5G05650	0.5	0.6	-1.0	-0.7	AT4G26390	AT4G26390	0.3	1.0	-1.6	0.0
AT3G14475	AT3G14475	0.5	1.6	-1.0	0.7	AT5G56490	AT5G56490	0.3	1.5	-1.6	0.6
AT3G55566	AT3G55566	0.5	0.8	-1.0	-0.2	AT5G26250	AT5G26250	0.3	0.0	-1.6	-6.2
AT4G09430	AT4G09430	0.5	1.3	-1.1	0.4	AT5G45670	AT5G45670	0.3	1.1	-1.6	0.1
AT4G16200	AT4G16200	0.5	1.0	-1.1	0.1	AT2G36053	AT2G36053	0.3	2.5	-1.6	1.3
AT2G43830	AT2G43830	0.5	1.4	-1.1	0.5	AT1G76910	AT1G76910	0.3	1.0	-1.7	0.0
AT1G73220	ATOCT1	0.5	1.8	-1.1	0.9	AT5G23270	STP11	0.3	0.8	-1.7	-0.3
AT2G34760	AT2G34760	0.5	0.7	-1.1	-0.5	AT5G60978	AT5G60978	0.3	1.7	-1.7	0.7
AT2G36440	AT2G36440	0.5	2.5	-1.1	1.3	AT1G20967	AT1G20967	0.3	1.0	-1.7	-0.1
AT4G09920	AT4G09920	0.5	1.4	-1.1	0.5	AT1G14760	AT1G14760	0.3	1.5	-1.7	0.6
AT5G66370	AT5G66370	0.5	1.0	-1.1	0.0	AT5G52300	LT165/RD29B	0.3	0.6	-1.7	-0.8
AT3G61117	AT3G61117	0.5	0.7	-1.1	-0.4	AT5G22960	AT5G22960	0.3	1.1	-1.8	0.1
AT3G42730	AT3G42730	0.5	0.5	-1.1	-0.9	AT5G24330	ATXR6	0.3	0.6	-1.8	-0.8
AT1G55990	AT1G55990	0.5	1.0	-1.2	-0.1	AT5G66816	AT5G66816	0.3	2.5	-1.8	1.3
AT2G27229	AT2G27229	0.4	0.6	-1.2	-0.9	AT5G54225	LCR83	0.3	1.0	-1.8	-0.1
AT1G02136	AT1G02136	0.4	1.1	-1.2	0.1	AT2G40850	AT2G40850	0.3	0.6	-1.9	-0.8
AT1G43830	AT1G43830	0.4	1.0	-1.2	0.1	AT2G44460	AT2G44460	0.3	8.5	-1.9	3.1
AT2G04490	AT2G04490	0.4	1.7	-1.2	0.8	AT4G30970	AT4G30970	0.3	0.9	-1.9	-0.1
AT1G38790	AT1G38790	0.4	0.9	-1.2	-0.1	AT1G30100	NCED5	0.3	2.9	-1.9	1.5
AT1G22560	AT1G22560	0.4	1.4	-1.2	0.4	AT1G69795	AT1G69795	0.3	3.4	-1.9	1.8
AT1G36830	AT1G36830	0.4	0.7	-1.2	-0.5	AT1G71530	AT1G71530	0.3	2.6	-1.9	1.4
AT1G48710	AT1G48710	0.4	0.6	-1.2	-0.6	AT5G66980	AT5G66980	0.2	1.2	-2.0	0.3
AT3G30725	ATGDU6	0.4	1.5	-1.2	0.5	AT1G11040	AT1G11040	0.2	1.3	-2.0	0.4
AT5G52640	HSP81-1	0.4	1.3	-1.2	0.4	AT1G59810	AGL50	0.2	1.2	-2.1	0.2
AT2G13431	AT2G13431	0.4	1.1	-1.2	0.1	AT5G06070	RBE	0.2	1.2	-2.2	0.2
AT4G06710	AT4G06710	0.4	0.9	-1.3	-0.1						
AT2G01770	VIT1	0.4	1.0	-1.3	0.0						
AT3G43356	AT3G43356	0.4	0.8	-1.3	-0.3						
AT5G56010	HSP81-3	0.4	0.9	-1.3	-0.1						
AT3G21990	AT3G21990	0.4	1.6	-1.3	0.7						
AT5G48850	AT5G48850	0.4	4.7	-1.3	2.2						
AT3G29545	AT3G29545	0.4	1.0	-1.3	0.0						
AT3G42181	AT3G42181	0.4	2.8	-1.3	1.5						
AT2G05720	AT2G05720	0.4	0.9	-1.3	-0.2						
AT4G04730	AT4G04730	0.4	1.5	-1.3	0.6						
AT4G14730	AT4G14730	0.4	0.9	-1.3	-0.1						
AT5G36937	AT5G36937	0.4	0.7	-1.3	-0.6						
AT2G25340	ATVAMP712	0.4	1.4	-1.3	0.5						
AT4G14723	AT4G14723	0.4	0.8	-1.3	-0.4						
AT3G08700	UBC12	0.4	1.1	-1.3	0.2						
AT1G56610	AT1G56610	0.4	0.9	-1.3	-0.1						
AT1G65585	AT1G65585	0.4	1.2	-1.4	0.3						
AT3G42800	AT3G42800	0.4	0.5	-1.4	-0.9						

SOG1 制御遺伝子として同定した 432 遺伝子を、ゼオシンによる発現誘導が高い遺伝子から順に示す。数値は野生型植物および *sog1-1* における遺伝子発現変化を Fold change および log₂(Fold change) で示す。

表 4. SOG1 標的候補遺伝子のリスト

AGI code	Gene symbol	Description	SBM	log ₂ (FC) in Col-0						
				zeocin		gamma-ray (100Gy)		HU		
				whole	whole	whole	whole	root	root	
				2 h	1.5 h	6 h	24 h	5 h	24 h	
AT5G07610	AT5G07610	F-box family protein	N	8.7						
AT4G25330	AT4G25330	unknown protein	N	8.2	3.2	3.6	0.8	-0.1	-0.2	
AT3G27630	SMR7		Y	7.6						
AT4G34510	KCS2	KCS2 (3-ketoacyl-CoA synthase 2); acyltransferase	N	6.4	3.4	4.6	0.2	0.1	0.2	
AT3G07800	ATTK1a	thymidine kinase, putative	N	6.4	4.1	3.9	1.7	2.4	3.0	
AT2G18193	AT2G18193	AAA-type ATPase family protein	Y	6.0						
AT4G21070	ATBRCA1	ATBRCA1 (BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY1); ubiquitin-protein ligase	Y	5.6	7.4	6.0	3.8	3.2	3.4	
AT5G20850	ATRAD51	ATRAD51 (Arabidopsis thaliana Ras Associated with Diabetes protein 51); damaged DNA binding	Y	5.5	5.1	3.2	1.3	1.4	2.1	
AT5G48720	XRI	XRI (X-RAY INDUCED TRANSCRIPT)	N	5.4	6.7	5.4	2.8	2.1	2.4	
AT1G07500	SMR5		Y	5.3	4.7	3.4	2.3	3.2	4.0	
AT4G22960	AT4G22960	hypothetical protein	N	5.2	3.5	4.4	2.3	2.4	3.4	
AT3G25250	AGC2-1/OXI1	AGC2-1 (OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1); kinase	Y	4.9	3.3	2.6	2.3	0.6	0.9	
AT4G02390	AIIPARP2/APP	APP (ARABIDOPSIS POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE); NAD+ ADP-ribosyltransferase	Y	4.8	5.3	4.4	2.2	1.3	2.7	
AT5G27050	AGL101	AGL101; transcription factor	Y	4.7	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	-0.1	
AT1G21528	AT1G21528	hypothetical protein	Y	4.7						
AT5G51580	AT5G51580	hypothetical protein	Y	4.7	0.7	0.4	0.2	0.0	0.0	
AT3G52115	ATCOM1/ATGR1/COM1	ATCOM1/ATGR1/COM1 (ARABIDOPSIS THALIANA GAMMA RESPONSE GENE 1, GAMMA RESPONSE 1)	Y	4.5						
AT3G27060	TSO2	TSO2 (TSO MEANING 'UGLY' IN CHINESE); ribonucleoside-diphosphate reductase	N	4.5	2.7	2.8	1.5	1.9	2.6	
AT2G18190	AT2G18190	AAA-type ATPase family protein	Y	4.4	0.8	0.6	0.1	1.5	1.4	
AT5G03780	TRFL10	TRFL10 (TRF-LIKE 10); DNA binding	N	4.3	5.3	4.3	2.1	2.0	2.7	
AT4G37490	CYCB1;1	CYC1 (CYCLIN 1); cyclin-dependent protein kinase regulator	N	4.3	4.8	4.2	2.0	0.1	0.3	
AT5G40840	SYN2/AIRAD21.1	SYN2 (Sister chromatid cohesion 1 (SCC1) protein homolog 2)	N	4.3	4.7	3.3	0.9	0.7	1.1	
AT2G36780	AT2G36780	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	Y	4.2						
AT3G45730	AT3G45730	hypothetical protein	Y	4.1	3.6	3.1	0.9	3.0	3.3	
AT5G60250	AT5G60250	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	N	4.1	4.2	3.6	3.4	0.5	3.3	
AT5G02220	SMR4		Y	4.0	4.2	2.3	0.6	1.0	1.7	
AT4G19130	AT4G19130	DNA binding / nucleic acid binding / zinc ion binding	N	3.9	3.9	2.7	1.5	0.7	1.0	
AT4G02110	AT4G02110	BRCT domain-containing protein	N	3.9						
AT5G49480	ATCP1	ATCP1 (CA2+-BINDING PROTEIN 1); calcium ion binding	Y	3.9	3.1	2.9	2.8	0.9	0.9	
AT3G29340	AT3G29340	zinc finger (C2H2 type) family protein	Y	3.9						
AT4G35740	RecQI3	RecQI3 (Recq-like 3); ATP binding / ATP-dependent helicase	N	3.9	3.0	2.7	0.9	0.8	1.0	
AT2G38340	DREB19	AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B)	Y	3.8	1.8	2.5	0.4	1.8	2.9	
AT4G28950	ATRAC7/ATROP9	ATRAC7/ATROP9 (RHO-RELATED PROTEIN FROM PLANTS 9); GTP binding	N	3.7	4.0	3.1	1.6	2.5	3.1	
AT3G58270	AT3G58270	meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	Y	3.7						
AT1G66780	AT1G66780	MATE efflux family protein	Y	3.7	0.5	0.2	0.0	0.0	0.5	
AT4G29170	ATMND1	ATMND1	N	3.5	3.6	2.5	0.8	2.3	2.4	
AT5G23910	AT5G23910	microtubule motor	Y	3.5	5.0	3.3	1.3	-0.2	-0.3	
AT5G66130	ATRAD17	ATRAD17 (RADIATION SENSITIVE)	N	3.5	3.5	2.9	1.5	0.6	1.5	
AT5G26170	WRKY50	WRKY50 (WRKY DNA-binding protein 50); transcription factor	Y	3.4						
AT5G54700	AT5G54700	ankyrin repeat family protein	Y	3.4	0.2	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	
AT5G49110	AT5G49110	hypothetical protein	Y	3.3	1.3	1.9	0.2	0.6	0.5	
AT1G68200	AT1G68200	zinc finger (CCCH-type) family protein	Y	3.3	1.3	0.7	0.2	-0.1	0.3	
AT4G13370	AT4G13370	hypothetical protein	N	3.3						
AT2G31320	ATPARP1	poly (ADP-ribose) polymerase, putative / NAD(+)-ADP-ribosyltransferase, putative / poly(ADP-ribose) synthetase, putative	Y	3.3	3.3	2.1	0.5	0.8	1.4	
AT2G45460	AT2G45460	forkhead-associated domain-containing protein / FHA domain-containing protein	N	3.3	4.3	3.0	1.7	1.0	1.6	
AT5G24280	GMI1	GAMMA-IRRADIATION AND MITOMYCIN C INDUCED 1	Y	3.3	5.4	5.4	3.1	1.7	2.0	
AT4G37030	AT4G37030	hypothetical protein	N	3.2						
AT2G30360	CIPK11	CIPK11 (SOS3-INTERACTING PROTEIN 4); kinase	N	3.1	3.1	2.5	1.4	0.1	1.2	
AT1G70440	SRO3	SRO3 (SIMILAR TO RCD ONE 3); NAD+ ADP-ribosyltransferase	Y	3.0						
AT5G48020	AT5G48020	hypothetical protein	N	2.9	3.7	3.2	1.3	0.5	0.8	
AT1G51130	AT1G51130	hypothetical protein	N	2.9						
AT3G42860	AT3G42860	zinc knuckle (CCHC-type) family protein	N	2.8	3.5	1.9	0.6	1.4	1.5	
AT4G39500	CYP96A11	CYP96A11 (cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 11); oxygen binding	Y	2.8	0.6	1.4	0.2	-0.1	0.8	
AT5G14490	ANAC085	ANAC085 (Arabidopsis NAC domain containing protein 85); transcription factor	Y	2.7						
AT3G13432	AT3G13432	hypothetical protein	Y	2.7						
AT5G66140	PAD2	PAD2 (20S proteasome alpha subunit D2); peptidase	Y	2.7	2.1	2.2	0.8	0.3	0.5	
AT3G01600	ANAC044	ANAC044 (Arabidopsis NAC domain containing protein 44); transcription factor	Y	2.6						
AT1G19250	FMO1	FMO1 (FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1); monooxygenase	N	2.6	0.6	2.3	-0.2	-0.7	-0.7	
AT1G15580	IAA5	IAA5 (indoleacetic acid-induced protein 5); transcription factor	N	2.6	1.9	1.2	-0.1	0.0	-0.1	
AT3G10930	AT3G10930	hypothetical protein	Y	2.5	2.4	1.7	2.9	0.6	0.1	
AT1G08260	EMB2284/POL2A/TIL1	EMB2284/POL2A/TIL1 (EMBRYO DEFECTIVE 2284); DNA-directed DNA polymerase	N	2.5	3.6	3.6	1.5	0.9	0.9	
AT2G38350	AT2G38350	hypothetical protein	N	2.5	0.2	-0.1	0.0	0.1	0.1	
AT3G02400	AT3G02400	forkhead-associated domain-containing protein / FHA domain-containing protein / AT hook motif-containing protein	Y	2.5	3.0	1.8	0.2	1.0	1.7	
AT1G32570	AT1G32570	hypothetical protein	Y	2.5	0.6	1.0	0.2	0.1	0.1	
AT1G03660	AT1G03660	hypothetical protein	Y	2.5	0.2	0.6	-0.9	0.4	0.4	
AT1G09815	POLD4	POLD4; delta DNA polymerase	N	2.4	2.7	2.2	0.9	0.6	1.2	
AT1G31280	AGO2	AGO2 (ARGONAUTE 2); nucleic acid binding	Y	2.4	3.0	1.3	0.9	0.3	1.0	
AT2G34920	EDA18	EDA18 (embryo sac development arrest 18); protein binding / zinc ion binding	N	2.4	2.2	1.2	0.5	-0.3	0.4	
AT2G21910	CYP96A5	CYP96A5 (cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 5); oxygen binding	Y	2.4	0.1	0.1	-0.1	0.0	0.0	
AT2G46610	At-RS31a	arginine/serine-rich splicing factor 31a	Y	2.4	3.4	2.5	0.8	1.6	1.9	
AT5G49790	AT5G49790	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase	N	2.4	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	
AT5G64060	ANAC103	ANAC103 (Arabidopsis NAC domain containing protein 103); transcription factor	N	2.4	3.5	3.3	2.1	1.5	2.0	
AT2G47680	AT2G47680	zinc finger (CCCH type) helicase family protein	Y	2.2	3.9	3.9	1.9	1.4	2.0	
AT3G55300	AT3G55300	pseudo	Y	2.1	0.3	0.4	0.1	0.1	0.1	
AT1G09180	ATSAR1/ATSARA1A	ATSAR1/ATSARA1A (ARABIDOPSIS THALIANA SECRETION-ASSOCIATED RAS SUPER FAMILY 1); GTP binding	N	2.1	2.9	1.6	1.1	-0.2	0.0	
AT5G51730	AT5G51730	hypothetical protein	N	2.1						
AT2G31335	AT2G31335	hypothetical protein	Y	2.1						
AT1G72790	AT1G72790	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	Y	2.1	2.2	2.4	-0.3	0.1	0.4	
AT4G17710	HDG4	homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein	N	2.0	0.4	0.8	0.4	0.0	0.3	

表 4. SOG1 標的遺伝子リスト (続き)

AGI code	Gene symbol	Description	SBM	log ₂ (FC) in Col-0					
				zeocin		gamma-ray (100Gy)		HU	
				whole		whole		root	
				2 h	1.5 h	6 h	24 h	5 h	24 h
AT3G42850	AT3G42850	galactokinase, putative	N	2.0	0.4	-0.1	-0.2	0.2	0.4
AT1G66810	AT1G66810	zinc finger (CCCH-type) family protein	Y	2.0	1.1	0.7	0.2	0.3	0.6
AT1G22240	APUM8	APUM8 (ARABIDOPSIS PUMILIO 8); RNA binding	N	2.0	0.1	-0.1	0.1	-0.4	-0.1
AT5G65350	HTR11	histone H3	N	2.0	0.0	-0.2	0.0	0.3	0.8
AT4G14225	AT4G14225	zinc finger (AN1-like) family protein	N	1.9					
AT3G09020	AT3G09020	alpha 1,4-glycosyltransferase family protein / glycosyltransferase sugar-binding DXD motif-containing protein	Y	1.9	1.8	1.0	-0.2	-0.5	0.2
AT3G20490	AT3G20490	hypothetical protein	Y	1.9	2.5	1.8	0.6	1.1	1.5
AT5G27030	TPR3	TPR3 (TOPLESS-RELATED 3)	N	1.9					
AT5G65300	AT5G65300	hypothetical protein	Y	1.9	0.7	0.7	1.5	-0.6	-0.2
AT2G25380	AT2G25380	pseudo	Y	1.9	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.0
AT2G39650	AT2G39650	hypothetical protein	Y	1.8	2.7	1.9	2.8	0.3	0.4
AT3G10500	ANAC053	ANAC053 (Arabidopsis NAC domain containing protein 53); transcription factor	N	1.8	2.0	1.9	0.5	0.3	0.4
AT5G22660	AT5G22660	F-box family protein	Y	1.8					
AT1G75700	HVA22G	HVA22G (HVA22-LIKE PROTEIN G)	N	1.8					
AT5G65360	H3.1	histone H3	N	1.7	1.0	-0.9	-0.3	0.1	0.5
AT5G10310	AT5G10310	hypothetical protein	N	1.7	0.3	-0.6	-0.8	-0.2	-0.1
AT1G03440	AT1G03440	leucine-rich repeat family protein	Y	1.7	1.2	0.2	-0.1	0.3	0.4
AT2G41630	TFIIB	TFIIB (TRANSCRIPTION FACTOR II B); RNA polymerase II transcription factor	Y	1.7	2.3	1.5	0.6	0.1	0.3
AT5G67300	ATMYB44/ATMYBR1	ATMYB44/ATMYBR1 (MYB DOMAIN PROTEIN 44); DNA binding / transcription factor	N	1.6	-1.3	-0.2	0.9	0.3	0.5
AT5G27760	AT5G27760	hypoxia-responsive family protein	Y	1.6	2.1	1.4	0.8	0.1	0.1
AT1G29640	AT1G29640	hypothetical protein	N	1.6					
AT5G66270	AT5G66270	zinc finger (CCCH-type) family protein	N	1.6					
AT2G30250	WRKY25	WRKY25 (WRKY DNA-binding protein 25); transcription factor	Y	1.6	3.5	3.6	1.1	0.3	0.3
AT3G19150	ICK4/KRP6	ICK4/KRP6 (KIP-RELATED PROTEIN 6); cyclin binding / cyclin-dependent protein kinase inhibitor	Y	1.6					
AT5G56780	ATET2	ARABIDOPSIS EFFECTOR OF TRANSCRIPTION2	N	1.6	2.4	0.6	0.1	0.1	0.3
AT1G51890	AT1G51890	leucine-rich repeat protein kinase, putative	Y	1.5	-0.2	0.4	-0.1	-0.1	-0.3
AT2G37240	AT2G37240	antioxidant/ oxidoreductase	N	1.5	0.8	0.7	0.1	0.7	1.3
AT3G19140	DNF	DAY NEUTRAL FLOWERING	N	1.5	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1
AT2G21790	R1/RNR1	R1/RNR1 (RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE 1); ribonucleoside-diphosphate reductase	Y	1.5	2.3	1.5	1.1	1.4	1.5
AT1G49980	AT1G49980	hypothetical protein	N	1.4	0.4	0.4	0.0	0.2	0.7
AT5G14930	SAG101	SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101)	Y	1.4	2.0	2.3	1.2	0.5	0.3
AT1G64620	AT1G64620	Dof-type zinc finger domain-containing protein	N	1.4	1.0	-0.3	0.0	0.2	0.3
AT2G46180	GC4	GC4 (GOLGIN CANDIDATE 4)	Y	1.4	1.8	1.6	-0.2	0.1	0.6
AT1G02970	ATWEE1	WEE1 (ARABIDOPSIS WEE1 KINASE HOMOLOG); kinase/ protein kinase	Y	1.4	1.9	0.1	0.6	0.3	0.9
AT5G51740	AT5G51740	peptidase M48 family protein	N	1.3	1.8	1.6	0.4	0.1	0.6
AT1G27730	STZ	STZ (SALT TOLERANCE ZINC FINGER); nucleic acid binding / transcription factor/ zinc ion binding	N	1.3	1.8	2.3	4.6	0.8	0.2
AT3G27620	AOX1C	AOX1C (alternative oxidase 1C); alternative oxidase	Y	1.3	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.9
AT5G49780	AT5G49780	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase	Y	1.3	0.2	0.9	0.6	0.1	0.4
AT2G31870	PARG1/TEJ	poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1	N	1.3	1.4	1.5	0.0	-0.1	0.1
AT5G46740	UBP21	UBP21 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 21); ubiquitin-specific protease	N	1.3	1.2	0.1	0.5	0.0	0.4
AT4G39780	AT4G39780	AP2 domain-containing transcription factor, putative	N	1.3	1.2	0.3	-0.3	0.3	0.2
AT5G22010	ATRFC1	ATRFC1 (REPLICATION FACTOR C 1); ATP binding	N	1.3					
AT1G12020	AT1G12020	hypothetical protein	N	1.3	2.3	0.9	1.0	0.4	1.0
AT3G57550	AGK2	AGK2 (GUANYLATE KINASE-ENCODING GENE 1)	Y	1.3	1.5	0.4	-0.2	0.3	0.5
AT5G06190	AT5G06190	hypothetical protein	N	1.3	0.9	0.9	0.1	0.9	1.6
AT5G36870	ATGSL09	ATGSL09 (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 9); 1,3-beta-glucan synthase	Y	1.3	0.3	0.1	0.3	0.0	-0.1
AT4G08950	EXO	EXORDIUM	Y	1.2	0.2	-0.2	0.2	-0.2	0.3
AT5G67360	ARA12	ARA12; subtilase	N	1.2	1.9	1.3	0.4	0.2	0.8
AT5G18270	ANAC087	ANAC087	Y	1.2	1.6	1.8	0.6	0.3	0.6
AT2G06510	ATRPA1A	ARABIDOPSIS THALIANA REPLICATION PROTEIN A 1A	Y	1.2	1.5	0.8	0.0	0.6	0.6
AT1G05490	CHR31	CHR31 (chromatin remodeling 31); ATP binding / DNA binding / helicase/ nucleic acid binding	N	1.2	0.2	0.9	0.2	0.0	0.3
AT3G15240	AT3G15240	hypothetical protein	N	1.2	1.5	1.2	-0.6	0.8	1.2
AT2G38250	AT2G38250	DNA-binding protein-related	Y	1.2	0.6	0.6	0.1	-0.5	-0.1
AT1G76180	ERD14	ERD14 (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14)	Y	1.2	1.3	1.5	0.3	0.1	0.7
AT3G13235	DDI1	DNA-damage inducible 1; ubiquitin family protein	Y	1.2	1.6	1.1	0.3	0.2	-0.2
AT1G20120	AT1G20120	family II extracellular lipase, putative	N	1.1	0.4	1.1	0.3	-0.1	-0.1
AT2G02240	MEE66	MEE66 (maternal effect embryo arrest 66)	Y	1.1					
AT5G02020	SIS	Salt Induced Serine rich	N	1.1	-0.5	-0.2	-1.0	0.6	0.3
AT4G01460	AT4G01460	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	N	1.1	0.5	0.3	-0.8	0.0	0.2
AT3G13380	BRL3	BRL3 (BRI1-LIKE 3); protein binding / protein kinase	N	1.1	2.3	1.7	0.6	0.4	0.5
AT5G49520	WRKY48	WRKY48 (WRKY DNA-binding protein 48); transcription factor	N	1.0	1.5	2.0	2.0	0.9	2.1
AT3G51920	ATCAM9	CAM9 (CALMODULIN 9); calcium ion binding	N	1.0	1.4	1.0	0.7	0.7	0.3
AT2G03870	EMB2816	EMBRYO DEFECTIVE 2816; small nuclear ribonucleoprotein	N	1.0	1.0	1.1	0.2	0.0	0.2

SOG1 標的候補遺伝子として同定した 146 遺伝子を、ゼオシンによる発現誘導が高い遺伝子から順に示す。また、それぞれの標的遺伝子のプロモーター上の CTT(N)₇AAG 配列 (SOG1-binding motif: SBM) の有 (Y) 無 (N) についても示す。さらに、ガンマ線照射 (Missirian *et al.*, 2014) および HU 処理 (Cools *et al.*, 2011) した時の発現プロファイルを右端に示す。数値は log₂(Fold change) で示し、赤色は増加を、青色は減少を表す。

表 5. AgriGO による SOG1 標的遺伝子の GO 解析

<i>p</i> -value	Term	bg total	bg item	query total	query item
3.00E-18	double-strand break repair	28397	110	143	16
8.70E-18	response to ionizing radiation	28397	93	143	15
4.30E-15	DNA repair	28397	307	143	19
3.70E-15	response to DNA damage stimulus	28397	352	143	20
6.40E-15	DNA metabolic process	28397	790	143	27
2.00E-14	response to gamma radiation	28397	75	143	12
3.20E-10	cellular response to stress	28397	1473	143	29
1.10E-09	DNA recombination	28397	255	143	13
2.40E-09	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	28397	4798	143	54
3.00E-09	DNA replication	28397	337	143	14
4.60E-09	recombinational repair	28397	68	143	8
4.60E-09	double-strand break repair via homologous recombination	28397	68	143	8
5.40E-09	cellular response to stimulus	28397	2355	143	35
3.40E-08	somatic cell DNA recombination	28397	32	143	6
3.90E-08	regulation of cellular process	28397	4595	143	50
4.40E-08	nitrogen compound metabolic process	28397	5675	143	57
6.60E-08	response to stress	28397	4089	143	46
7.70E-08	M phase	28397	306	143	12
2.10E-07	meiotic cell cycle	28397	273	143	11
2.60E-07	M phase of meiotic cell cycle	28397	219	143	10
2.60E-07	meiosis	28397	219	143	10
2.60E-07	response to stimulus	28397	6292	143	59
3.30E-07	cell cycle phase	28397	352	143	12
4.70E-07	regulation of gene expression	28397	2695	143	34
8.20E-07	regulation of transcription, DNA-dependent	28397	2372	143	31
7.50E-07	regulation of macromolecule biosynthetic process	28397	2491	143	32
8.50E-07	response to abiotic stimulus	28397	2635	143	33
8.50E-07	regulation of transcription	28397	2376	143	31
7.90E-07	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	28397	2496	143	32
9.00E-07	regulation of biological process	28397	5235	143	51
9.40E-07	regulation of nitrogen compound metabolic process	28397	2517	143	32
9.40E-07	regulation of RNA metabolic process	28397	2388	143	31
1.10E-06	regulation of cellular metabolic process	28397	2928	143	35
1.40E-06	regulation of macromolecule metabolic process	28397	2829	143	34
2.00E-06	response to chitin	28397	421	143	12
2.10E-06	cell cycle process	28397	586	143	14
2.50E-06	regulation of biosynthetic process	28397	2634	143	32
2.40E-06	regulation of cellular biosynthetic process	28397	2631	143	32
2.60E-06	regulation of metabolic process	28397	3186	143	36
3.70E-06	cell cycle	28397	802	143	16
6.30E-06	transcription	28397	2620	143	31
6.20E-06	transcription, DNA-dependent	28397	2618	143	31
6.40E-06	RNA biosynthetic process	28397	2621	143	31
6.60E-06	regulation of primary metabolic process	28397	2761	143	32
1.20E-05	reciprocal meiotic recombination	28397	145	143	7
1.70E-05	meiosis I	28397	153	143	7
2.30E-05	response to radiation	28397	1263	143	19
3.30E-05	chromosome organization	28397	752	143	14
4.60E-05	DNA methylation	28397	180	143	7
4.60E-05	DNA alkylation	28397	180	143	7

「AgriGO」プログラムを用いて SOG1 標的遺伝子を GO 解析し、*p*-value が小さい GO タームから順に示す。上位 50 の GO タームについて示し、DNA 修復に関連する GO タームを赤色で、細胞周期に関連する GO タームを青色で表示した。また、プログラムで解析対象となったシロイヌナズナの全遺伝子数 (bg total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (bg item)、そして、プログラムの解析対象となった SOG1 標的遺伝子数 (query total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (query item) をそれぞれの GO タームごとに示した。

表 6. BiNGO による SOG1 標的遺伝子の GO 解析

adjusted p-Value	GO term	bg total	bg item	query total	query item
5.86E-19	cellular response to DNA damage stimulus	26837	289	126	23
2.93E-16	DNA metabolic process	26837	499	126	25
2.93E-16	DNA repair	26837	264	126	20
1.33E-12	cellular response to stress	26837	809	126	26
1.46E-09	nucleic acid metabolic process	26837	3177	126	44
1.46E-09	DNA replication	26837	119	126	11
5.74E-09	nucleobase-containing compound metabolic process	26837	3603	126	46
2.37E-08	double-strand break repair	26837	85	126	9
7.07E-08	heterocycle metabolic process	26837	3911	126	46
1.19E-07	cellular response to stimulus	26837	2724	126	37
1.41E-07	cell cycle	26837	433	126	15
1.65E-07	cellular aromatic compound metabolic process	26837	4049	126	46
1.78E-07	regulation of biological process	26837	5484	126	55
2.40E-07	DNA recombination	26837	117	126	9
3.59E-07	regulation of nitrogen compound metabolic process	26837	3023	126	38
3.59E-07	organic cyclic compound metabolic process	26837	4184	126	46
4.09E-07	response to ionizing radiation	26837	33	126	6
4.09E-07	regulation of macromolecule metabolic process	26837	3190	126	39
4.74E-07	regulation of primary metabolic process	26837	3073	126	38
8.05E-07	response to stress	26837	3428	126	40
8.05E-07	regulation of cellular process	26837	4962	126	50
8.80E-07	regulation of cellular metabolic process	26837	3161	126	38
1.31E-06	biological regulation	26837	6051	126	56
1.61E-06	regulation of metabolic process	26837	3388	126	39
8.30E-06	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	26837	2601	126	32
2.61E-05	response to stimulus	26837	6254	126	54
3.62E-05	cell cycle process	26837	293	126	10
3.75E-05	regulation of RNA biosynthetic process	26837	2521	126	30
3.75E-05	regulation of nucleic acid-templated transcription	26837	2521	126	30
4.29E-05	DNA-dependent DNA replication	26837	77	126	6
4.37E-05	regulation of RNA metabolic process	26837	2548	126	30
5.19E-05	negative regulation of protein modification process	26837	45	126	5
6.24E-05	regulation of macromolecule biosynthetic process	26837	2743	126	31
8.81E-05	cellular nitrogen compound metabolic process	26837	5159	126	46
8.81E-05	regulation of transcription, DNA-templated	26837	2508	126	29
9.57E-05	regulation of cellular biosynthetic process	26837	2812	126	31
1.08E-04	regulation of biosynthetic process	26837	2832	126	31
1.38E-04	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	26837	2724	126	30
1.68E-04	regulation of gene expression	26837	2902	126	31
1.76E-04	regulation of cellular protein metabolic process	26837	450	126	11
1.79E-04	negative regulation of kinase activity	26837	29	126	4
1.79E-04	negative regulation of protein kinase activity	26837	29	126	4
2.01E-04	negative regulation of protein phosphorylation	26837	30	126	4
2.23E-04	regulation of protein modification process	26837	165	126	7
2.23E-04	negative regulation of phosphorylation	26837	31	126	4
2.58E-04	regulation of protein metabolic process	26837	476	126	11
2.61E-04	negative regulation of phosphorus metabolic process	26837	33	126	4
2.61E-04	cellular macromolecule metabolic process	26837	6851	126	54
2.61E-04	negative regulation of phosphate metabolic process	26837	33	126	4
2.89E-04	negative regulation of transferase activity	26837	34	126	4
3.11E-04	DNA strand elongation involved in DNA replication	26837	12	126	3
3.11E-04	DNA strand elongation	26837	12	126	3
3.33E-04	meiotic cell cycle process	26837	121	126	6
3.65E-04	macromolecule metabolic process	26837	7514	126	57
4.66E-04	negative regulation of protein metabolic process	26837	192	126	7
4.66E-04	negative regulation of cellular protein metabolic process	26837	191	126	7
4.66E-04	response to gamma radiation	26837	14	126	3
4.94E-04	meiotic nuclear division	26837	80	126	5
5.64E-04	reciprocal meiotic recombination	26837	42	126	4
5.64E-04	reciprocal DNA recombination	26837	42	126	4

表 6. BiNGO による SOG1 標的遺伝子の GO 解析 (続き)

adjusted p-Value	GO term	bg total	bg item	query total	query item
6.82E-04	meiotic cell cycle	26837	141	126	6
7.91E-04	DNA replication checkpoint	26837	3	126	2
1.45E-03	DNA biosynthetic process	26837	54	126	4
1.51E-03	meiosis I	26837	55	126	4
1.51E-03	3'-UTR-mediated mRNA destabilization	26837	4	126	2
1.55E-03	negative regulation of biological process	26837	939	126	14
1.73E-03	nucleobase-containing compound biosynthetic process	26837	2148	126	23
1.84E-03	regulation of protein kinase activity	26837	109	126	5
1.86E-03	double-strand break repair via homologous recombination	26837	59	126	4
1.86E-03	regulation of kinase activity	26837	110	126	5
1.91E-03	nitrogen compound metabolic process	26837	8201	126	58
1.92E-03	recombinational repair	26837	60	126	4
1.94E-03	regulation of protein phosphorylation	26837	112	126	5
2.14E-03	mRNA destabilization	26837	5	126	2
2.14E-03	protein ADP-ribosylation	26837	5	126	2
2.14E-03	RNA destabilization	26837	5	126	2
2.17E-03	nuclear division	26837	116	126	5
2.48E-03	regulation of cell cycle	26837	187	126	6
2.48E-03	regulation of phosphorylation	26837	120	126	5
3.00E-03	DNA-dependent DNA replication maintenance of fidelity	26837	6	126	2
3.00E-03	DNA ligation involved in DNA repair	26837	6	126	2
3.41E-03	negative regulation of macromolecule metabolic process	26837	572	126	10
3.41E-03	regulation of transferase activity	26837	130	126	5
4.04E-03	lagging strand elongation	26837	7	126	2
4.10E-03	primary metabolic process	26837	9461	126	63
4.19E-03	cellular macromolecule biosynthetic process	26837	3591	126	31
4.28E-03	regulation of phosphate metabolic process	26837	138	126	5
4.37E-03	regulation of phosphorus metabolic process	26837	139	126	5
5.01E-03	DNA integrity checkpoint	26837	8	126	2
5.01E-03	DNA ligation	26837	8	126	2
5.20E-03	heterocycle biosynthetic process	26837	2370	126	23
5.26E-03	macromolecule biosynthetic process	26837	3653	126	31
5.41E-03	negative regulation of metabolic process	26837	616	126	10
6.03E-03	negative regulation of cell cycle	26837	38	126	3
7.09E-03	response to abiotic stimulus	26837	1977	126	20
7.10E-03	negative regulation of cellular process	26837	642	126	10
7.10E-03	organelle fission	26837	158	126	5
7.14E-03	response to water deprivation	26837	328	126	7
7.20E-03	regulation of mRNA stability	26837	10	126	2
7.20E-03	cell cycle arrest	26837	10	126	2

「BiNGO」プログラムを用いて SOG1 標的遺伝子を GO 解析し、*p*-value が小さい順に並べた上位 100 の GO タームを示す。赤色は p53 標的遺伝子にも共通して濃縮される細胞周期制御関連の代表的な GO タームを、青色は SOG1 標的遺伝子では濃縮されて p53 標的遺伝子では濃縮されない DNA 修復関連の代表的な GO タームを示す。また、プログラムで解析対象となったシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の全遺伝子数 (bg total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (bg item)、そして、プログラムの解析対象となった SOG1 標的遺伝子数 (query total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (query item) をそれぞれの GO タームごとに示した。

表 7. BiNGO による p53 標的遺伝子の GO 解析

adjusted p-Value	GO term	bg total	bg item	query total	query item
5.86E-18	single-organism cellular process	23885	8913	417	251
4.44E-13	single-organism process	23885	12773	417	304
2.04E-11	regulation of signal transduction	23885	2513	417	98
4.62E-11	negative regulation of biological process	23885	4873	417	151
9.35E-11	negative regulation of cellular process	23885	4416	417	140
2.25E-10	cellular process	23885	14471	417	322
5.45E-10	positive regulation of biological process	23885	5483	417	160
7.77E-10	apoptotic process	23885	796	417	46
8.36E-10	regulation of biological process	23885	11414	417	270
1.15E-09	positive regulation of cellular process	23885	4977	417	148
1.20E-09	biological regulation	23885	11996	417	279
1.20E-09	regulation of cellular process	23885	10771	417	258
1.66E-09	cellular component organization	23885	4702	417	141
1.66E-09	regulation of molecular function	23885	2773	417	98
1.66E-09	regulation of apoptotic process	23885	1404	417	63
1.66E-09	positive regulation of catalytic activity	23885	1298	417	60
1.66E-09	programmed cell death	23885	831	417	46
1.82E-09	regulation of localization	23885	2581	417	93
1.82E-09	regulation of signaling	23885	3003	417	103
1.96E-09	signal transduction by p53 class mediator	23885	80	417	15
2.04E-09	regulation of programmed cell death	23885	1421	417	63
2.38E-09	regulation of cell communication	23885	2981	417	102
2.39E-09	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	23885	2771	417	97
2.84E-09	regulation of cell death	23885	1547	417	66
3.45E-09	cellular component organization or biogenesis	23885	4867	417	143
4.81E-09	regulation of response to stimulus	23885	3375	417	110
4.81E-09	cell death	23885	870	417	46
5.00E-09	single-multicellular organism process	23885	5380	417	153
7.95E-09	positive regulation of macromolecule metabolic process	23885	2842	417	97
8.33E-09	positive regulation of signal transduction	23885	1336	417	59
8.33E-09	developmental process	23885	5422	417	153
8.50E-09	single-organism developmental process	23885	5378	417	152
8.50E-09	positive regulation of cellular protein metabolic process	23885	1376	417	60
1.20E-08	regulation of catalytic activity	23885	2162	417	80
1.48E-08	regulation of developmental process	23885	2420	417	86
1.48E-08	positive regulation of molecular function	23885	1623	417	66
1.73E-08	regulation of cellular metabolic process	23885	5584	417	155
1.86E-08	regulation of nitrogen compound metabolic process	23885	5346	417	150
3.03E-08	positive regulation of cellular metabolic process	23885	2884	417	96
3.32E-08	regulation of multicellular organismal process	23885	2804	417	94
3.79E-08	regulation of phosphorus metabolic process	23885	1665	417	66
3.84E-08	positive regulation of protein metabolic process	23885	1476	417	61
4.68E-08	regulation of primary metabolic process	23885	5470	417	151
4.87E-08	positive regulation of metabolic process	23885	3091	417	100
5.70E-08	apoptotic signaling pathway	23885	271	417	23
7.75E-08	regulation of phosphate metabolic process	23885	1660	417	65
8.19E-08	anatomical structure morphogenesis	23885	2061	417	75
1.11E-07	intrinsic apoptotic signaling pathway	23885	149	417	17
1.11E-07	positive regulation of hydrolase activity	23885	742	417	39
1.11E-07	regulation of metabolic process	23885	6042	417	161
1.18E-07	anatomical structure development	23885	5061	417	141
1.22E-07	regulation of multicellular organismal development	23885	1882	417	70
1.24E-07	tissue development	23885	1569	417	62
1.27E-07	regulation of phosphorylation	23885	1418	417	58
1.34E-07	multicellular organism development	23885	4689	417	133
1.58E-07	cell cycle	23885	1061	417	48
1.89E-07	regulation of macromolecule metabolic process	23885	5596	417	151
2.00E-07	cell cycle process	23885	697	417	37
2.29E-07	regulation of protein metabolic process	23885	2627	417	87
2.56E-07	negative regulation of apoptotic process	23885	870	417	42

表 7. BiNGO による p53 標的遺伝子の GO 解析 (続き)

adjusted p-Value	GO term	bg total	bg item	query total	query item
2.80E-07	regulation of cellular component organization	23885	2341	417	80
3.27E-07	cellular developmental process	23885	3677	417	110
3.40E-07	regulation of intracellular signal transduction	23885	1540	417	60
3.75E-07	cellular metabolic process	23885	7348	417	184
3.83E-07	regulation of protein phosphorylation	23885	1317	417	54
3.83E-07	negative regulation of programmed cell death	23885	885	417	42
4.19E-07	anatomical structure formation involved in morphogenesis	23885	854	417	41
4.24E-07	positive regulation of protein phosphorylation	23885	889	417	42
4.24E-07	cell differentiation	23885	3563	417	107
5.05E-07	intracellular signal transduction	23885	1218	417	51
5.51E-07	positive regulation of cell communication	23885	1644	417	62
5.73E-07	regulation of cellular protein metabolic process	23885	2430	417	81
6.42E-07	positive regulation of signaling	23885	1652	417	62
8.15E-07	regulation of locomotion	23885	843	417	40
8.15E-07	system development	23885	4078	417	117
1.17E-06	metabolic process	23885	8481	417	203
1.17E-06	positive regulation of proteolysis	23885	300	417	22
1.20E-06	negative regulation of cell cycle	23885	382	417	25
1.58E-06	positive regulation of phosphorylation	23885	936	417	42
1.58E-06	positive regulation of intracellular signal transduction	23885	866	417	40
1.64E-06	regulation of cell migration	23885	731	417	36
1.72E-06	positive regulation of protein modification process	23885	1085	417	46
1.72E-06	negative regulation of cell death	23885	976	417	43
1.76E-06	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	23885	69	417	11
1.87E-06	regulation of angiogenesis	23885	233	417	19
2.07E-06	positive regulation of programmed cell death	23885	576	417	31
2.24E-06	positive regulation of response to stimulus	23885	1922	417	67
2.28E-06	animal organ morphogenesis	23885	952	417	42
2.51E-06	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	23885	31	417	8
3.05E-06	cell cycle arrest	23885	90	417	12
3.08E-06	positive regulation of cell death	23885	620	417	32
3.08E-06	regulation of hydrolase activity	23885	1223	417	49
3.13E-06	intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	23885	58	417	10
3.74E-06	regulation of biological quality	23885	3454	417	101
3.74E-06	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	23885	3686	417	106
3.90E-06	positive regulation of apoptotic signaling pathway	23885	174	417	16
4.25E-06	regulation of anatomical structure morphogenesis	23885	941	417	41
4.57E-06	animal organ development	23885	2922	417	89
4.60E-06	regulation of cell motility	23885	768	417	36
4.84E-06	positive regulation of apoptotic process	23885	570	417	30

p53 標的遺伝子に対して、「BiNGO」プログラムにより GO 解析し、*p*-value が小さい順に並べた上位 100 の GO タームを示す。赤色は SOG1 標的遺伝子にも共通して濃縮される細胞周期制御関連の代表的な GO タームを、青色は p53 標的遺伝子では濃縮されて SOG1 標的遺伝子では濃縮されないアポトーシス関連の代表的な GO タームを示す。また、プログラムで扱ったマウス (*Mus musculus*) の全遺伝子数 (bg total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (bg item)、そして、プログラムで扱った p53 標的遺伝子数 (query total) と、各 GO タームに属する遺伝子数 (query item) をそれぞれの GO タームごとに示した。

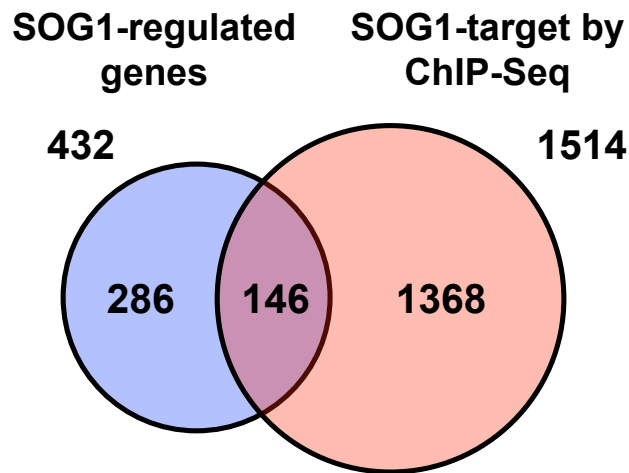


図 5. SOG1 の標的候補遺伝子の同定

発芽後 2 週間目の野生型植物および *sog1-1* 変異体に、15 μ M ゼオシンを 2 時間処理し、マイクロアレイ解析および ChIP-Seq 解析を行った。ベン図は、マイクロアレイにより同定された SOG1 制御遺伝子 (432 遺伝子) および ChIP-Seq により得られた SOG1 標的候補遺伝子 (1514 遺伝子) の数を示す。両方の解析により共通に得られた、146 遺伝子を SOG1 標的候補遺伝子として同定した。SOG1 制御遺伝子に関する情報は、表 3 に示す。SOG1 標的候補遺伝子の情報は、表 4 に示す。

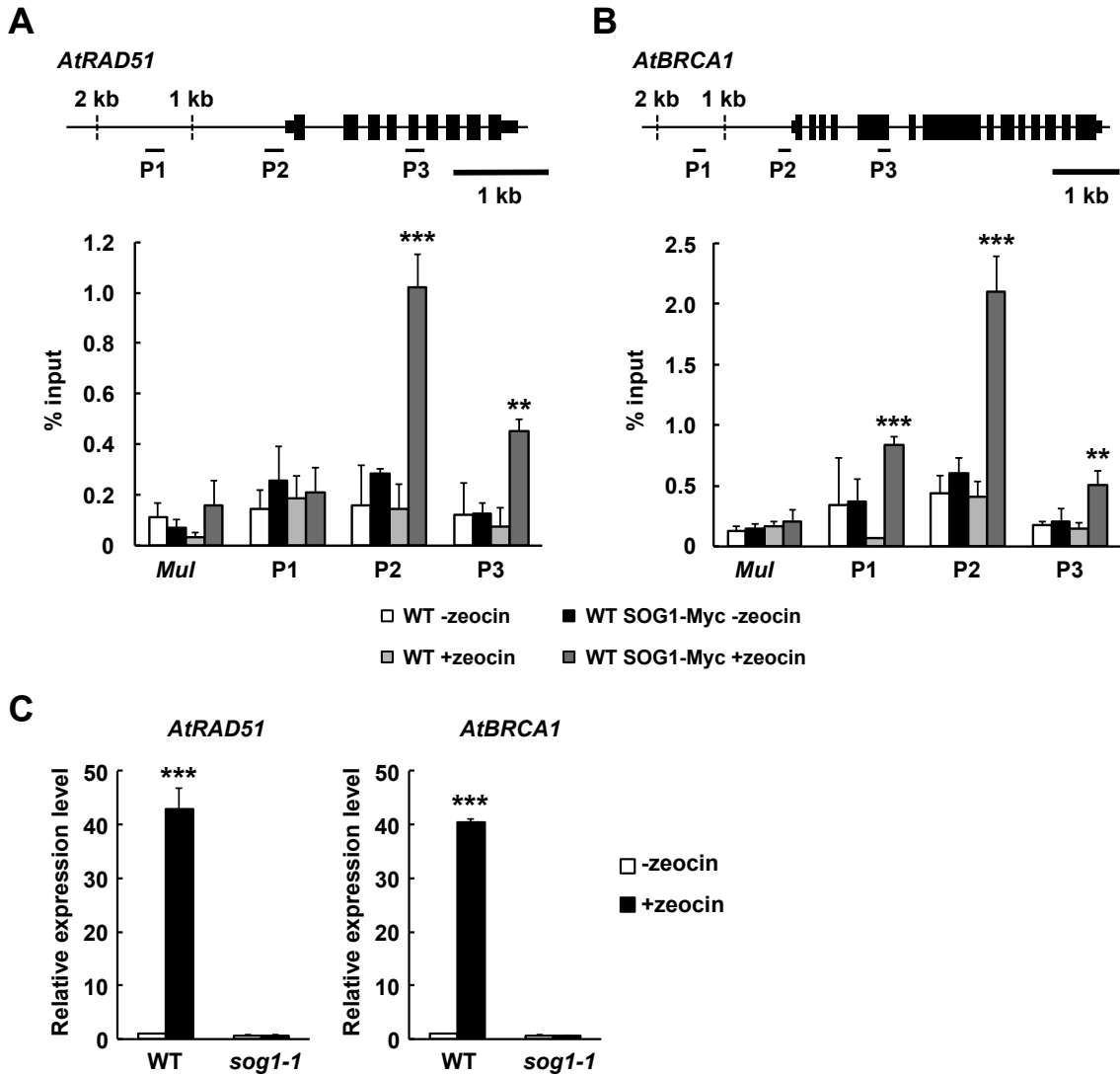


図 6. SOG1 は DNA 損傷依存的に *AtRAD51* と *AtBRCA1* の転写を直接誘導する

(A, B) [上段] *AtRAD51* および *AtBRCA1* の遺伝子領域の模式図。P1、P2、P3 は、ChIP-PCR で用いたプライマーの結合部位を示す。[下段] 発芽後 2 週間目の *ProSOG1::SOG1-MYC* および野生型植物 (WT) を、15 μ M ゼオシンを含む (+zeocin) もしくは含まない (-zeocin) 培地で 2 時間処理し、その後、抗 Myc 抗体を用いて ChIP-PCR を行った。*Mu-like transposon (Mul)* 遺伝子は、SOG1 の結合に関するネガティブコントロールとして用いた。得られた値は input の値で標準化し、% input として表示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物の値と比較した (** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(C) *AtRAD51* と *AtBRCA1* の遺伝子発現変化。発芽後 2 週間目の野生型植物 (WT) および *sog1-1* を、15 μ M ゼオシンを含む (+zeocin) もしくは含まない培地 (-zeocin) で 2 時間処理し、定量 RT-PCR により発現量を定量した。発現量は *ACT2* の発現量で標準化し、ゼオシン未処理を 1 とした時の相対値で表した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、ゼオシン未処理のサンプルの値と比較した (*** : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

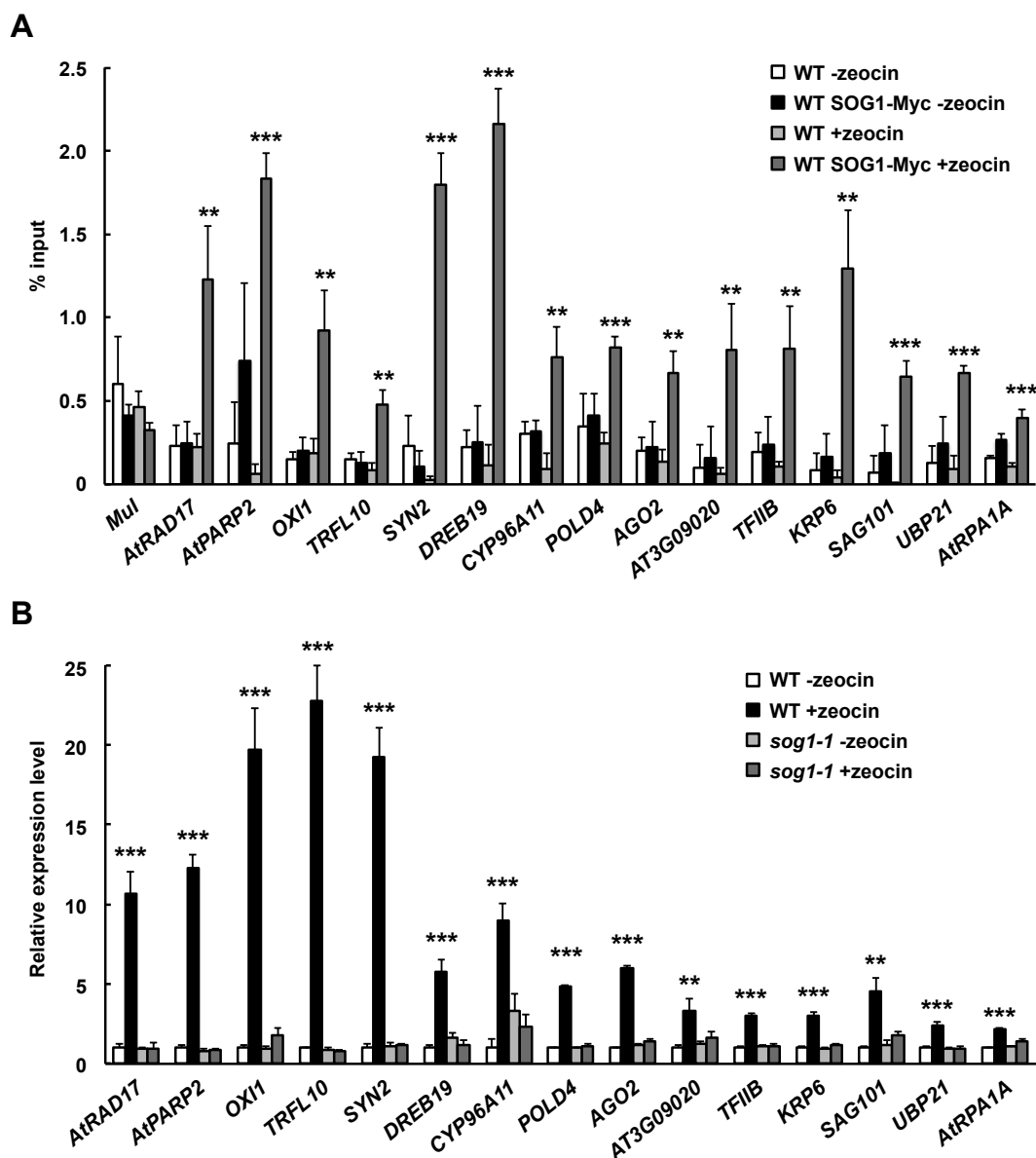


図 7. SOG1 標的遺伝子の同定

(A) 発芽後 2 週間目の野生型植物 (WT) および *ProSOG1:SOG1-MYC* を、15 μ M ゼオシンを含む (+zeocin) もしくは含まない (-zeocin) 培地で 2 時間処理し、その後、抗 Myc 抗体を用いて ChIP-PCR を行った。*Mu-like transposon* (*Mul*) 遺伝子は SOG1 の結合に関するネガティブコントロールとして用いた。得られた値は input の値で標準化し、% input として表示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物の値と比較した (** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$, Student's t-test)。(B) 発芽後 2 週間目の野生型植物 (WT) および *sog1-1* を、15 μ M ゼオシンを含む (+zeocin) もしくは含まない (-zeocin) 培地で 2 時間処理し、定量 RT-PCR により発現量を定量した。発現量は *ACT2* の発現量で標準化し、ゼオシン未処理を 1 とした時の相対値で表した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、ゼオシン未処理のサンプルの値と比較した (** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$, Student's t-test)。

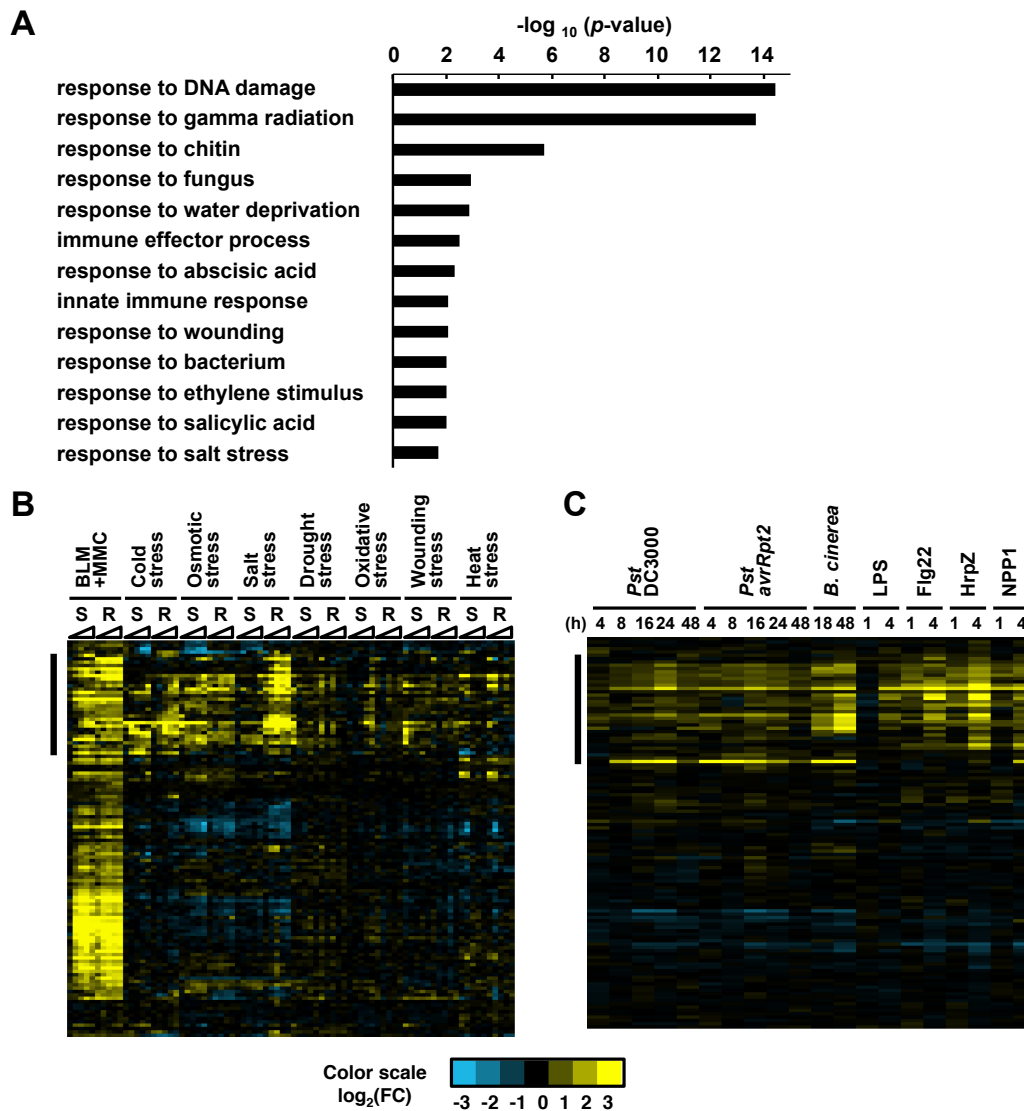


図 8. SOG1 標的遺伝子の生物・非生物ストレスに対する遺伝子発現変化

(A) SOG1 標的遺伝子に濃縮される GO タームの内、「response to stimulus」に属する GO タームと p 値を示す ($p < 0.01$)。

(B-D) SOG1 標的遺伝子の発現クラスタリング解析。非生物ストレス (B) または生物ストレスおよび植物免疫シグナルの誘発物処理 (C) の遺伝子発現プロファイルを「Cluster 3.0」を用いてクラスタリング解析した。ヒートマップの色は Mock に対する相対的な発現量 (Fold change: FC) を対数 (\log_2) で示しており、黄色は発現上昇、水色は発現低下を示す。黒線は比較した複数の実験条件で発現誘導される傾向にある遺伝子群を示す (B、C の黒線が示す遺伝群はそれぞれ全体の 25% (30/118)、27% (32/118) を占める)。また、(B)における白色の三角形は処理後の経過時間 (1、3、6、12、24 時間) を、S および R はサンプリングした組織 (それぞれ、shoot と root) を示す。また(C)におけるエリシターおよび薬剤に関する略語は以下の通り。LPS: lipopolysaccharide、Flg22: flagellin peptide (22 amino acids)、HrpZ : harpin protein HrpZ、NPP1 : necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1。

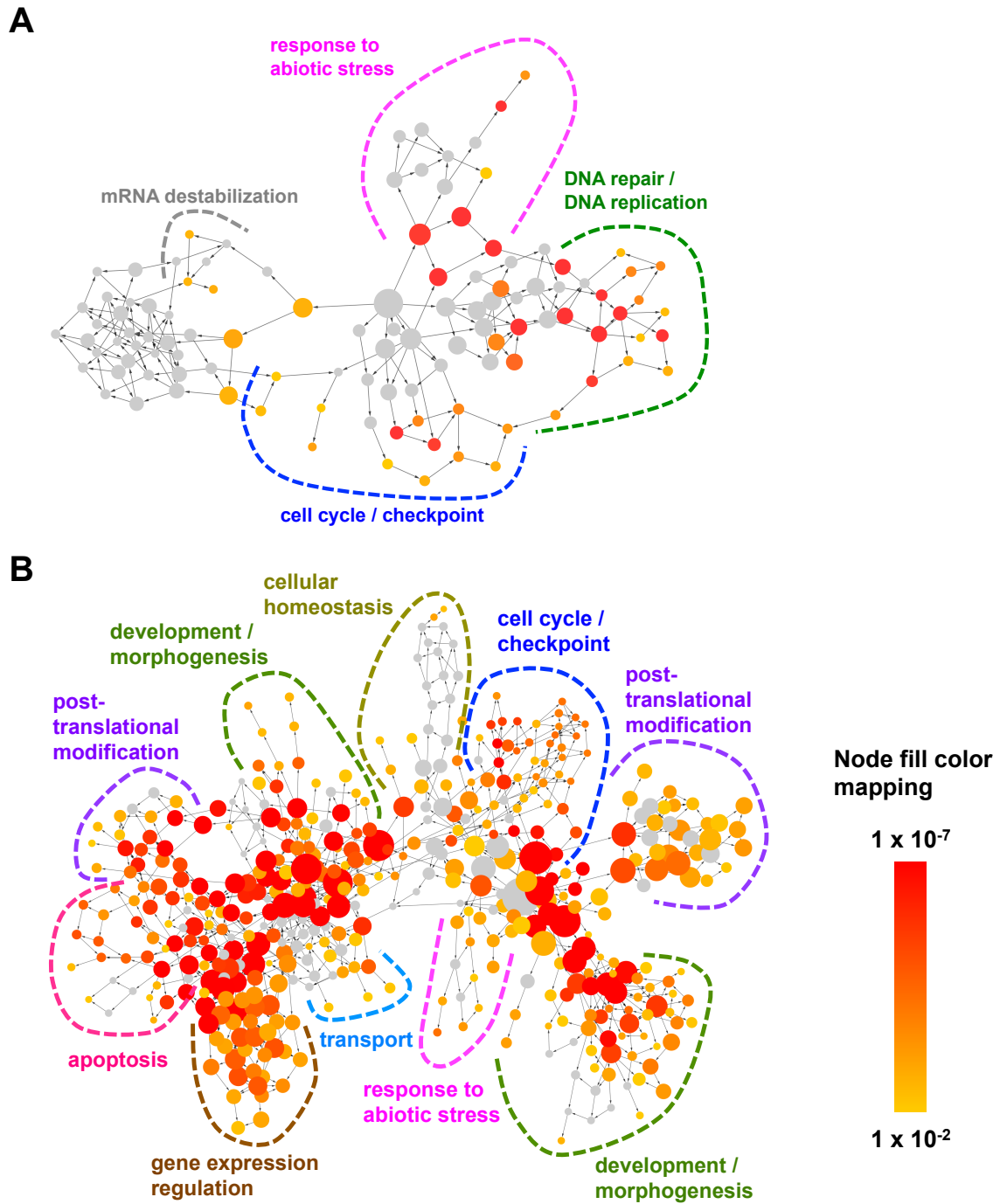


図 9. SOG1 および p53 の標的遺伝子の比較

SOG1 標的遺伝子 (A) および p53 標的遺伝子 (B) を、「BiNGO」により GO 解析し、Cytoscape により視覚化した。灰色以外のノードは有意に濃縮していた GO タームを示す ($p < 0.01$)。それぞれのノードの大きさは、それぞれの GO に所属する遺伝子の数の割合を表す。ノード同士を繋ぐ線は、関連する GO タームを示す。詳細は、表 6 および表 7 に示す。

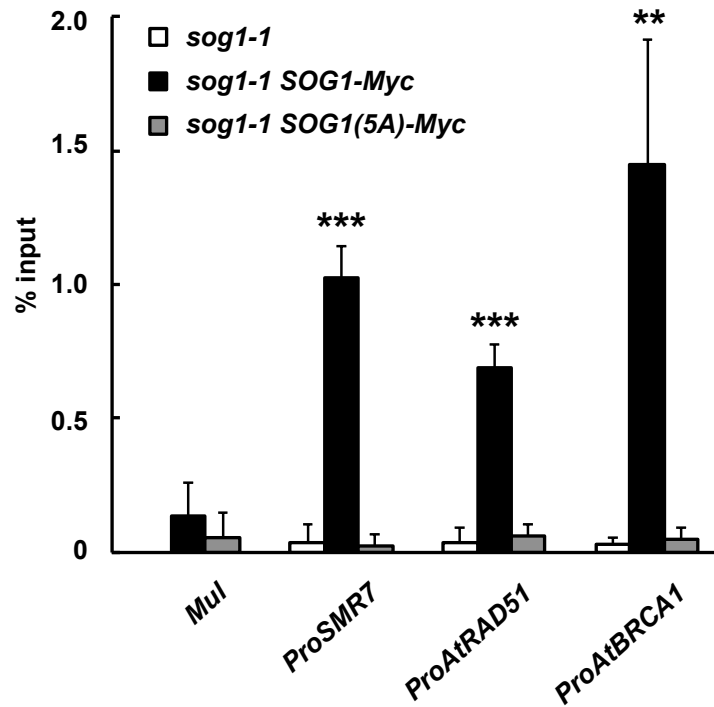


図 10. SOG1 のリン酸化は標的プロモーターへの結合に必要である

発芽後 2 週間目の *sog1-1*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1:SOG1(5A)-MYC* (非リン酸化型 SOG1) を、15 μ M ゼオシンを含む培地で 2 時間処理し、抗 Myc 抗体を用いて ChIP-PCR を行った。*Mul* はネガティブコントロールとして用いた。得られた値は input の値で標準化し、% input で示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、*sog1-1* のサンプルの値と比較した (** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

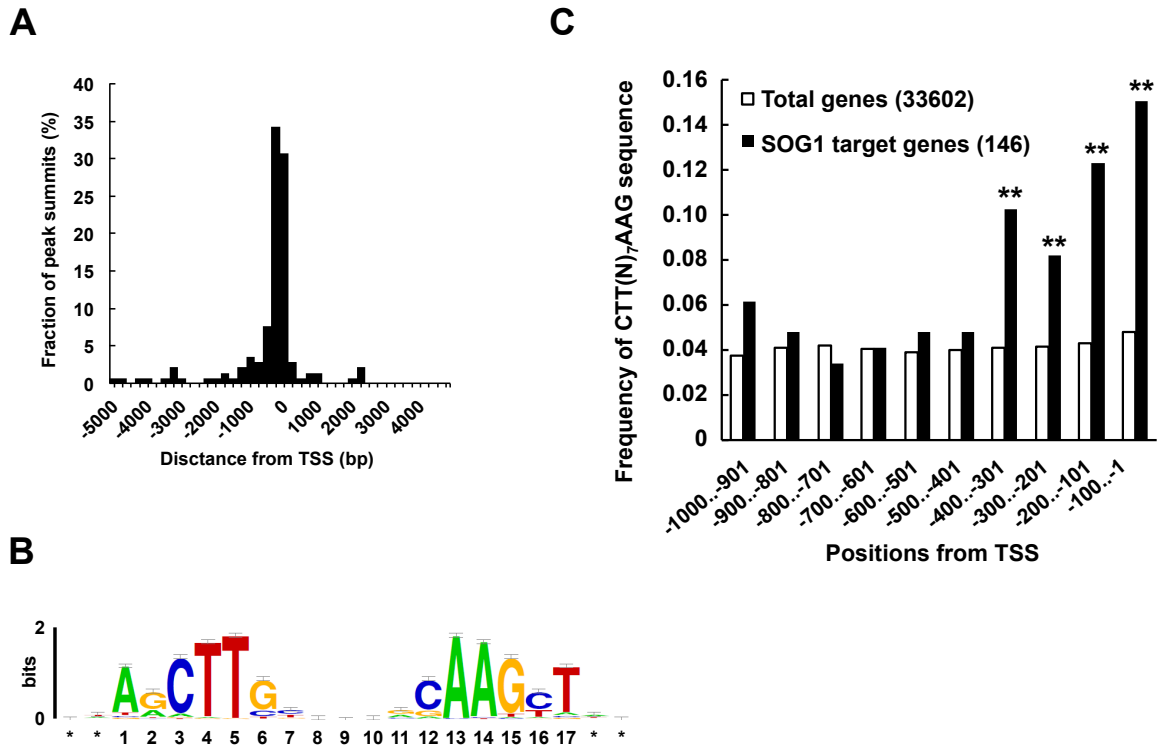


図 11. SOG1 結合配列の同定

(A) ChIP-Seq によって得られたシグナルピークの転写開始点 (transcription start site: TSS) からの距離。ヒストグラムは、TSS から上流および下流の 250 bp 毎のシグナルピークの割合を表す。

(B) SOG1 標的遺伝子の TSS から上流 1 kb のプロモーター配列を、RSAT-spaced dyad tool および WebLogo で解析した。各塩基の文字の高さ (bits) は、解析した配列間で高く保存されていることを示す。

(C) SOG1 標的遺伝子のプロモーター (146 遺伝子、黒) および、シロイヌナズナの全遺伝子のプロモーター (33602 遺伝子、白) に存在する CTT(N)₇AAG 配列の出現頻度。TSS から上流 100 bp 毎の CTT(N)₇AAG 配列が存在する割合を示す。有意差はシロイヌナズナの全遺伝子プロモーターの値と比較した (** : $p < 0.01$, Fisher's exact test)。

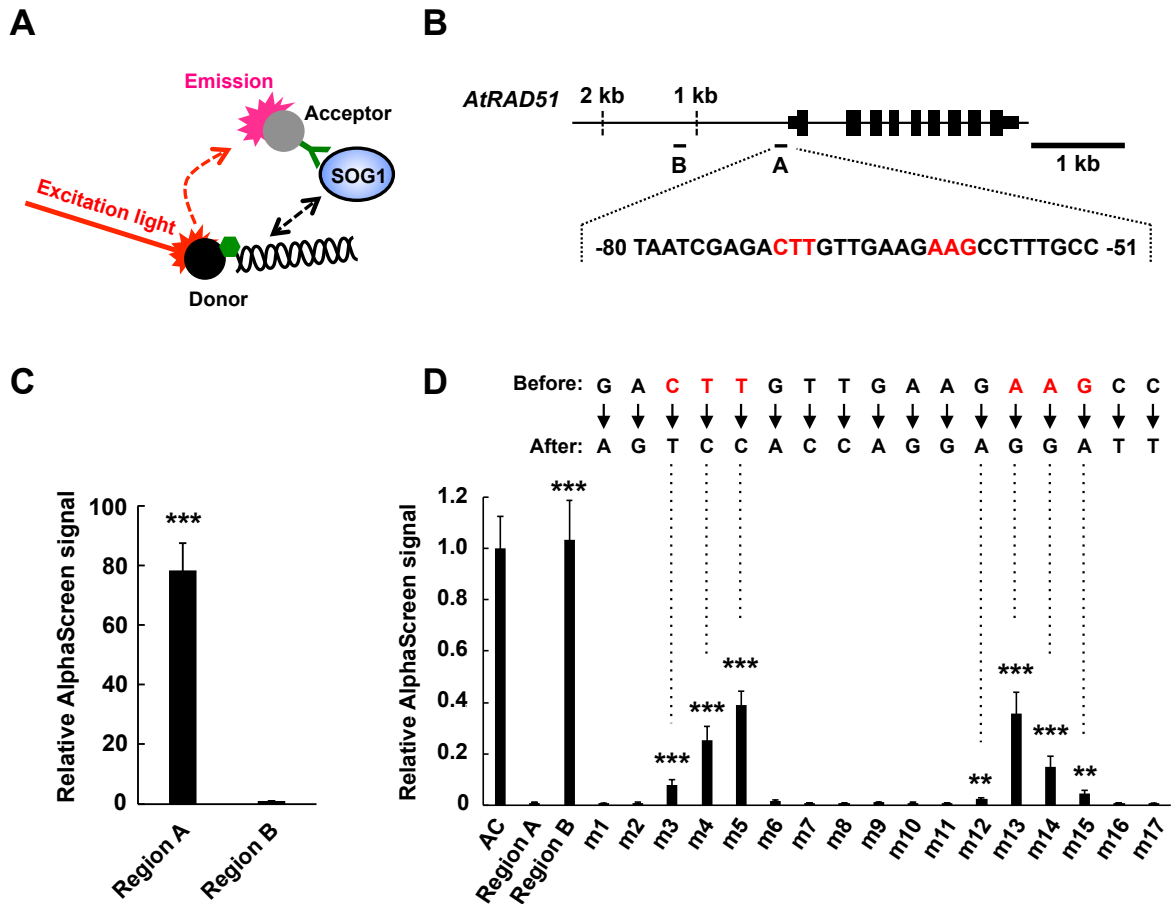


図 12. SOG1 は *AtRAD51* プロモーター内の CTT(N)₇AAG に結合する

(A) AlphaScreen システムによる *in vitro* タンパク質-二本鎖 DNA 結合実験の模式図。SOG1 タンパク質は FLAG タグを介して、二本鎖 DNA はビオチンを介して、それぞれアクセプタービーズおよびドナービーズと結合しており、SOG1 と二本鎖 DNA が結合し、両ビーズが近接すると (<200 nm)、レーザー照射によりドナービーズを介してアクセプタービーズによる化学発光反応が検出される。

(B) *AtRAD51* 遺伝子座の模式図。黒色の四角はエクソンを表す。黒色の線で示した A の領域 (Region A) には CTT(N)₇AAG 配列 (赤色) が含まれるが、B の領域 (Region B) には存在しない。

(C) AlphaScreen システムによる、SOG1 タンパク質と Region A および Region B の結合実験。値は、ビオチンラベル化した二本鎖 DNA を用いたときのシグナル値を、ビオチンラベル化していない二本鎖 DNA のシグナル値で割って示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は Region B の値と比較した (***) : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(D) ビオチンラベル化していない二本鎖 DNA を用いた、SOG1-Region A 結合に対する競合試験。SOG1 タンパク質とビオチンラベル化した二本鎖 DNA (Region A) の結合反応に対し、Region A もしくは Region B、点変異を導入した Region A の競合二本鎖 DNA (m1 から m17) を加えた時のシグナル値を示した。値は競合二本鎖 DNA が無い状態のときの値 (AC) を 1 とした時の相対値で示した。平均値および標準偏差は独立して 4 回行って得られた値を基に算出した。有意差は競合二本鎖 DNA (Region A) を結合反応に加えたときの値と比較した (** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

A

Target	Position from TSS	Sequence
<i>ProAtBRCA1</i>	-36..-7	TCTGTAAAG CTT TCAAGGG AAG CCTCTTTG

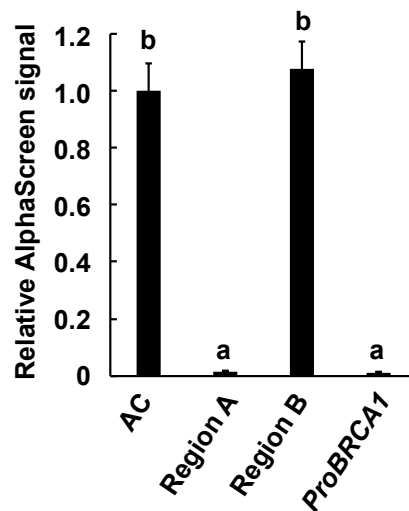
B

図 13. SOG1 は CTT(N)₇AAG 配列を含む *AtBRCA1* プロモーター領域に結合する

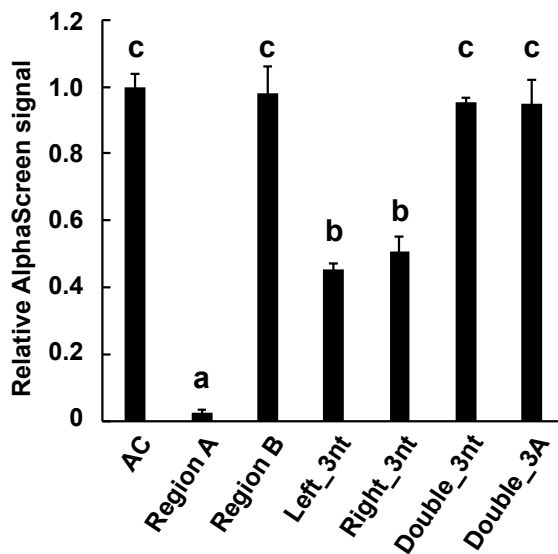
(A) AlphaScreen システムによる SOG1-Region A 結合に対する競合試験に用いた、*AtBRCA1* プロモーター由来の非ビオチンラベル化二本鎖 DNA (競合二本鎖 DNA) の配列を示す。CTT(N)₇AAG 配列を赤色で表した。

(B) (A) で示した *AtBRCA1* プロモーター由来の競合二本鎖 DNA が SOG1-Region A の結合に競合するかを調べた結果を示す。SOG1 タンパク質とビオチンラベル化二本鎖 DNA (Region A) の結合反応に対し、Region A もしくは Region B、(A)で示した *AtBRCA1* プロモーター由来の配列の競合二本鎖 DNA を加えた。値は競合二本鎖 DNA が無い状態のときの値 (AC) を 1 として相対値を示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

A

Competitor	Sequence
Region A	TAATCGAGACTTGTGAAGAAGCCTTTGCC
Left_3nt	TAATCGAGATCCGTTGAAGAAGCCTTTGCC
Right_3nt	TAATCGAGACTTGTGAAGGGACCTTTGCC
Double_3nt	TAATCGAGATCCGTTGAAGGGACCTTTGCC
Double_3A	TAATCGAGAAAATTGAAGAAACCTTTGCC
del	TAATCGAGACTTGT AGAAGCCTTTGCC

B



C

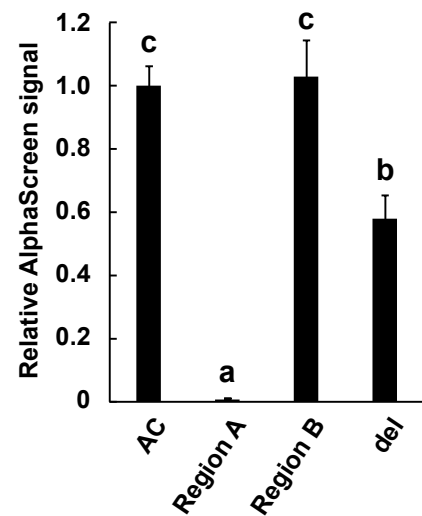


図 14. SOG1 の CTT(N)₇AAG 配列への結合には両端の CTT および AAG とその間の 7 塩基という距離が重要である

(A) AlphaScreen システムによる SOG1-Region A 結合に対する競合試験に用いた、非ビオチン化二本鎖 DNA (競合二本鎖 DNA) の配列。赤色は CTT(N)₇AAG 配列を、青色は変異を導入後の配列を示す。

(B、C) (A) で示した競合二本鎖 DNA が SOG1-Region A の結合に競合するかを調べた結果を示す。SOG1 タンパク質とビオチンラベル化二本鎖 DNA (Region A) の結合反応に対し、Region A もしくは Region B、(A)で示した配列の競合二本鎖 DNA を加えた時のシグナル値を、競合二本鎖 DNA が無い状態のときの値 (AC) を 1 として相対的に示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意味な差があることを示す ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey's HSD test)。

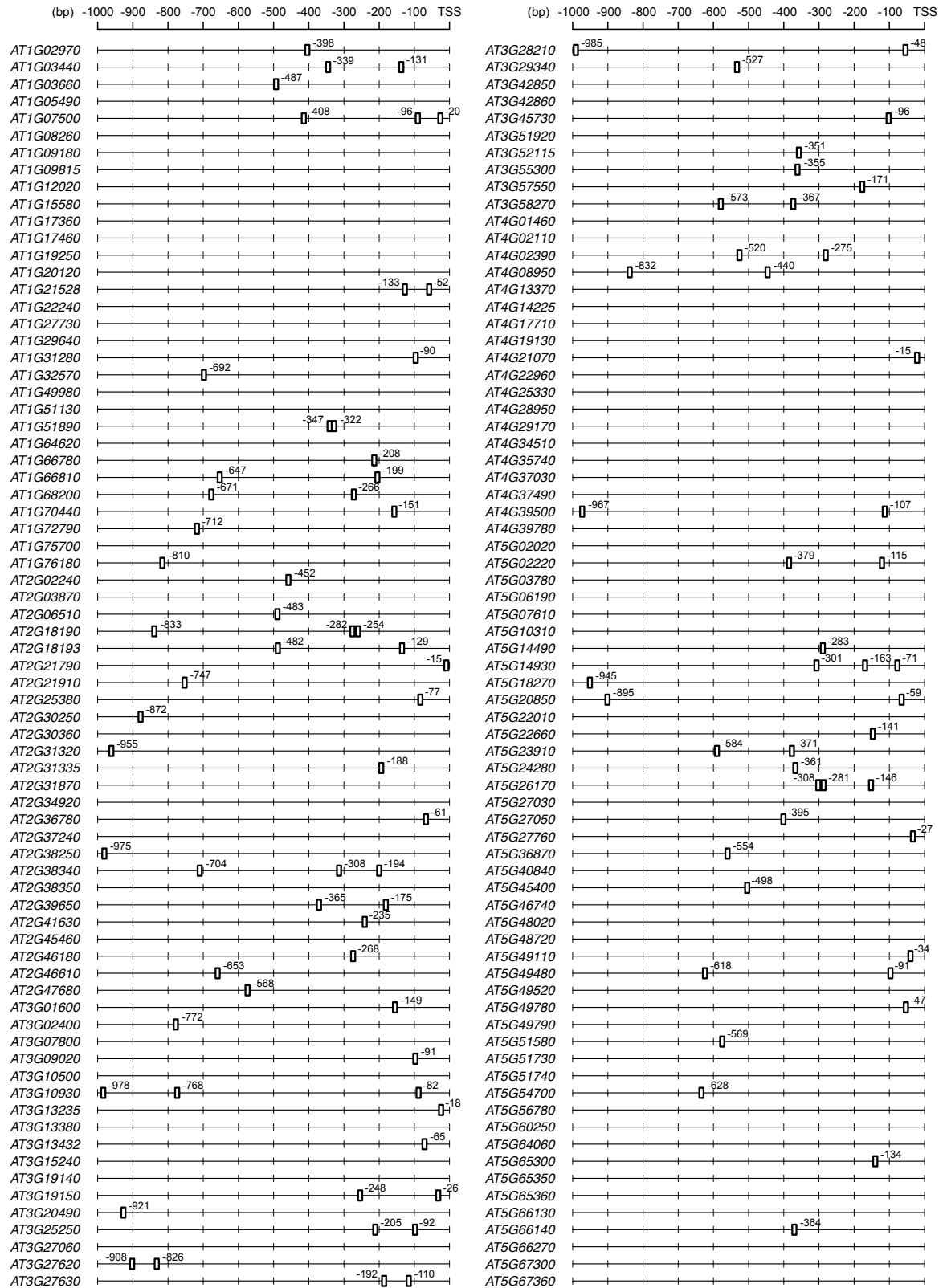


図 15. SOG1 標的遺伝子プロモーターの CTT(N)₇AAG 配列の位置

横線は転写開始点 (transcription start site : TSS) から上流 1 kb の SOG1 標的遺伝子のプロモーターを示し、100 bp 毎に縦線で区切りをつけた。白色の四角は CTT(N)₇AAG の位置、その上の数字は TSS からの距離を示す。

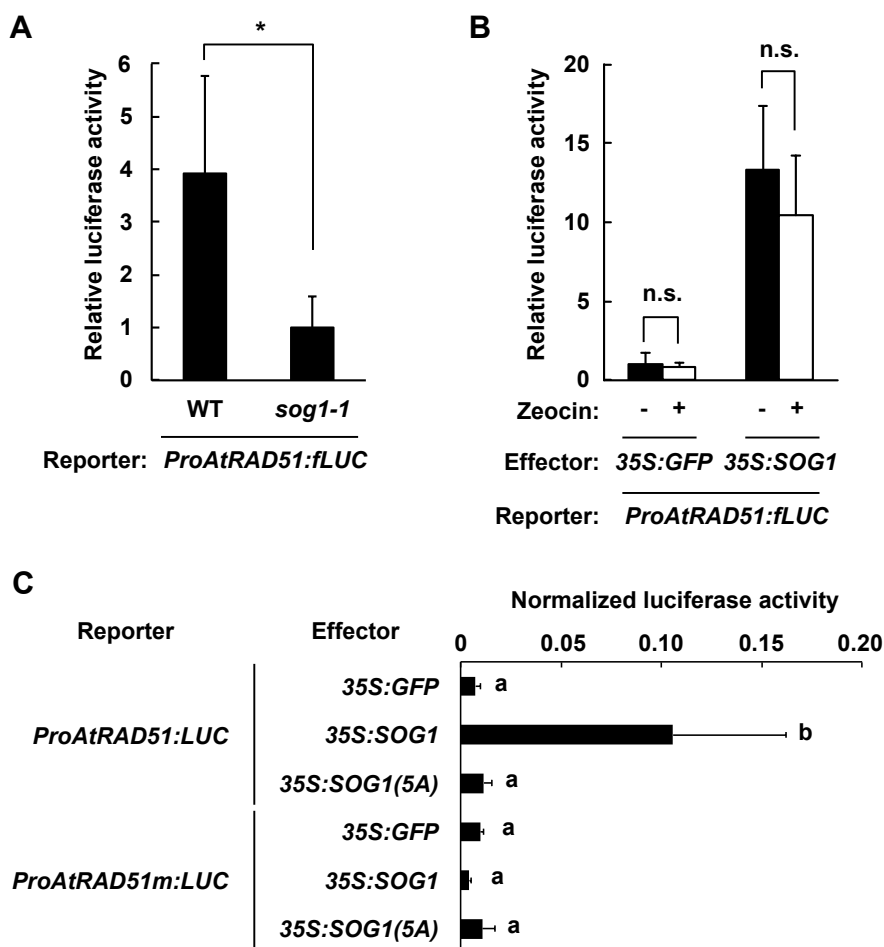


図 16. SOG1 は CTT(N)₇AAG を介して *AtRAD51* プロモーターを活性化する

プロトプラストを用いた一過性発現系による *AtRAD51* プロモーター活性の測定。

(A) レポーターコンストラクトおよびリファレンスコンストラクトを野生型植物 (WT) または *sog1-1* の本葉から単離したプロトプラストで一過的に発現させ、15 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターコンストラクトによる値 (fLUC) はリファレンスコンストラクトによる値 (rLUC) で標準化し、*sog1-1* で得られた値を 1 とした時の相対値を求めた。平均値および標準偏差は独立して行った 3 回の実験の値を基に算出した (* : $p < 0.05$ 、Student's t-test)。

(B) (A) で用いたコンストラクトに加え、エフェクターコンストラクトを *sog1-1* の本葉から単離したプロトプラストで一過的に発現させた後、13 時間後にゼオシン (15 μM) を含むまたは含まない培地で 2 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。fLUC の値は rLUC の値で標準化し、35S:GFP を発現させたゼオシン未処理のサンプルの値を 1 としたときの相対値を求めた。平均値および標準偏差は独立して行った 3 回の実験の値を基に算出し、有意差検定には Student's t-test を用いた。

(C) レポーターコンストラクトおよびエフェクターコンストラクト、リファレンスコンストラクトを *sog1-1* の本葉から単離したプロトプラストで一過的に発現させ、15 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。fLUC の値は rLUC の値で標準化した。平均値および標準偏差は独立して行った 5 回の実験の値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意味な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

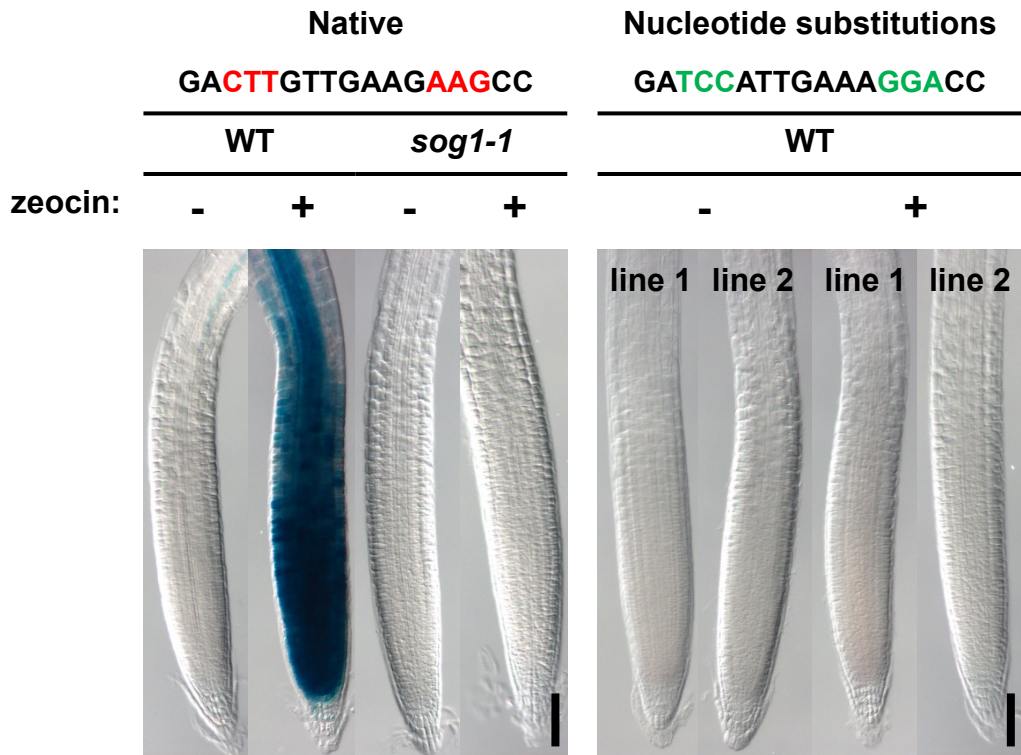


図 17. DNA 損傷に応答した *AtRAD51* プロモーターの活性化には、CTT(N)₇AAG 配列が必須である

発芽後 7 日目の *ProAtRAD51::GUS* もしくは *ProAtRAD51m::GUS* を導入した野生型植物 (WT) または *sog1-1* に、15 μM ゼオシンを含む (+ zeocin) または含まない (- zeocin) MS 液体培地で 2 時間処理し、GUS 染色から 9 時間後の根端の写真を示す。スケールバーは 100 μm を表す。各上段は CTT(N)₇AAG 近傍の配列を示し、塩基置換前の配列 (Native) を赤色で、塩基置換後 (Nucleotide substitutions) を緑色で記した。

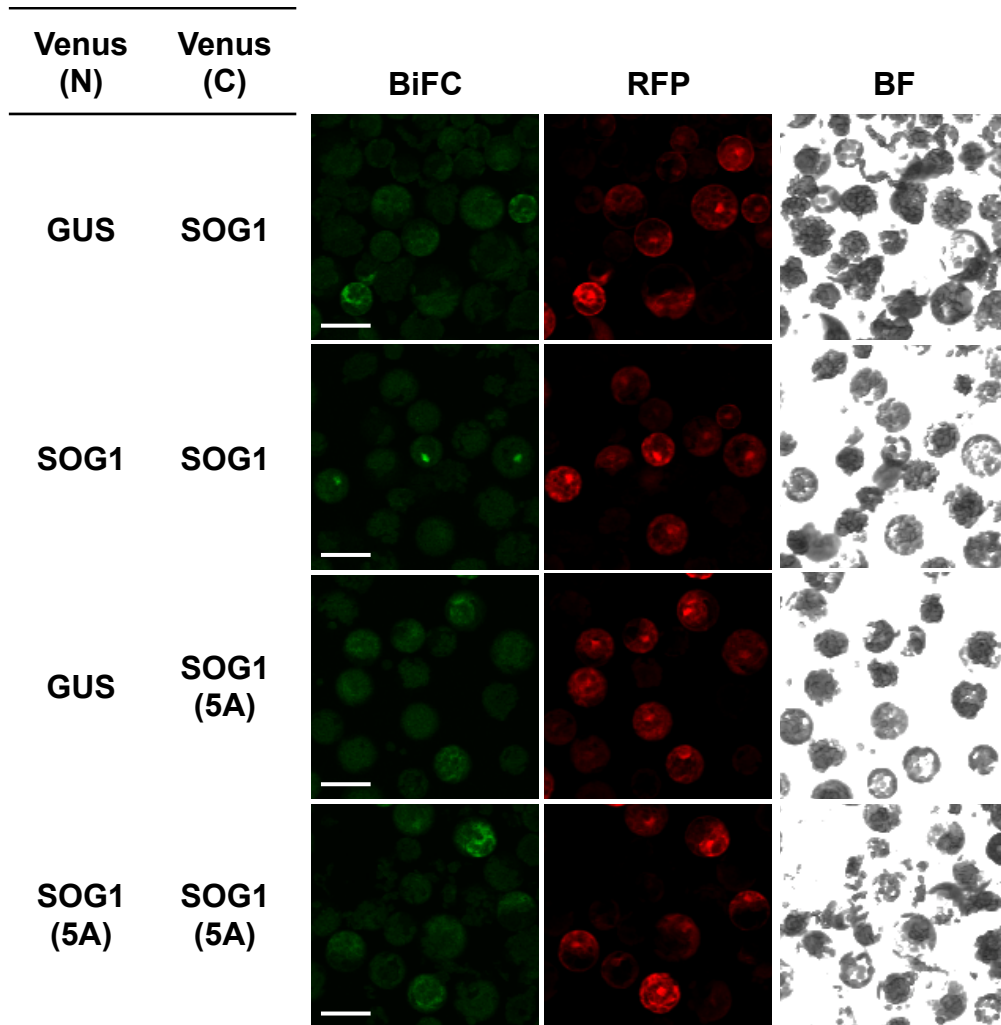


図 18. BiFC アッセイによる SOG1 タンパク質同士の相互作用の解析

Venus の N 末端側 (Venus (N)) または C 末端側 (Venus (C)) を GUS または SOG1、SOG1 (5A) と融合したタンパク質を発現するコンストラクト (*35S:VC-GUS*, *VC-SOG1*, *VC-SOG1(5A)*, *VN-SOG1*, *VN-SOG1(5A)*)、およびリファレンスコンストラクト (*35S:RFP*) を野生型植物の本葉から単離したプロトプラストで一過的に発現させ、20 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光を観察した。BiFC はタンパク質間相互作用により再構成された Venus タンパク質から得られるシグナル、RFP は導入コントロールとして用いた RFP タンパク質から得られるシグナル、BF は明視野 (bright field) を示す。スケールバーは 40 μm を示す。

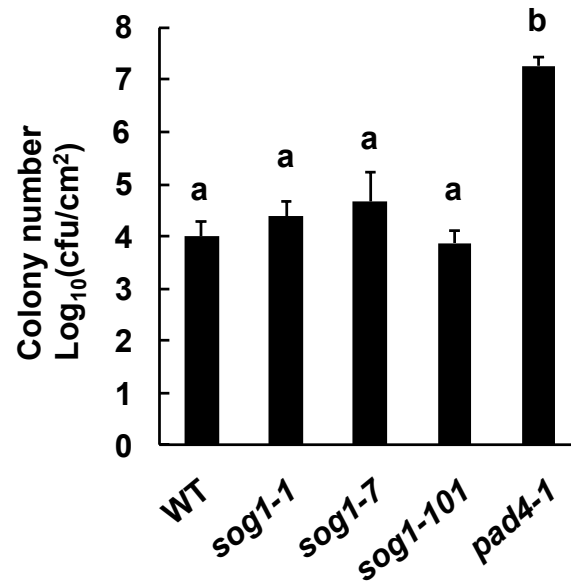


図 19. *sog1* 変異体は病原細菌 *Pst* DC3000 に対して野生型植物と同様の罹病性を示す

発芽後 5 週間目の野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-7*、*sog1-101*、*pad4-1* の本葉に *Pst* DC3000 を感染させ、接種後 3 日目の病原菌の数を測定した。平均値および標準偏差は、独立して行った 5 回の実験の値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意味な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

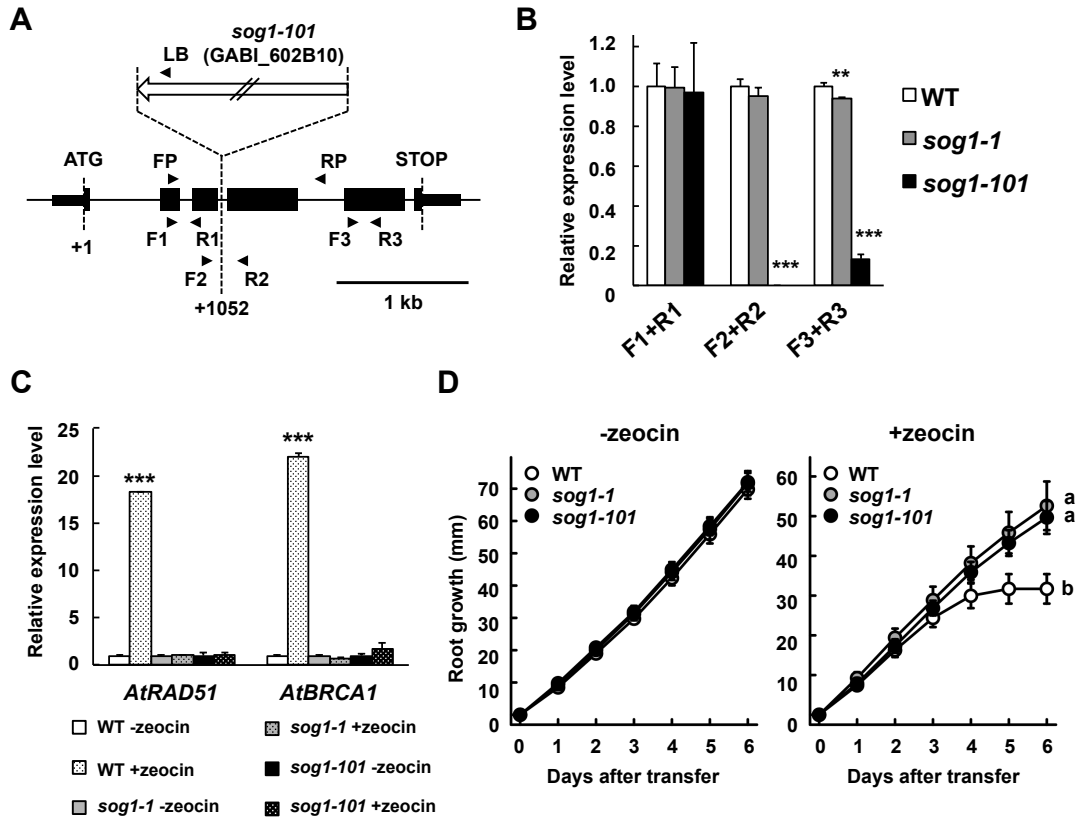


図 20. T-DNA 挿入変異体 *sog1-101* は DNA 損傷応答を欠損する

(A) *sog1-101* (GABI_602B10) の *SOG1* 遺伝子座。黒色の四角はエキソンを表し、縦線で翻訳開始(ATG) および終止の位置 (STOP) を示す。白色の矢印は T-DNA を表し、数字 (+ 1052) は翻訳開始点 ATG からの距離 (bp) を示す。黒色の矢頭は、T-DNA の挿入確認および (B) で使用したプライマーの結合部位を示す。

(B) 発芽後 5 日目の野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-101* における *SOG1* 遺伝子の発現量。(A) で示したプライマーセットを用いて、定量 RT-PCR により、*SOG1* 遺伝子量を測定した。発現量は *ACT2* で標準化し、野生型を 1 としたときのと相対値で示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物の値と比較した (***) : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(C) 発芽後 5 日目の野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-101* を、15 μ M ゼオシンを含む (+ zeocin) もしくは含まない (- zeocin) MS 液体培地で 2 時間処理し、RNA を抽出後、定量 RT-PCR により *AtRAD51* および *AtBRCA1* の発現量を定量した。発現量は *ACT2* で標準化し、野生型を 1 としたときのと相対値で示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、ゼオシン未処理のサンプルと比較した (***) : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(D) 野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-101* の根の伸長。発芽後 5 日目の野生型植物、*sog1-1*、*sog1-101* を、0.6 μ M ゼオシンを含む (+ zeocin) または含まない (- zeocin) MS 寒天培地に移し、その後の 6 日間の根の伸長を測定した。平均値および標準偏差は 15 個体以上の結果を基に算出した。各植物体のアルファベットが異なる場合、観察最終日の根の伸長に統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

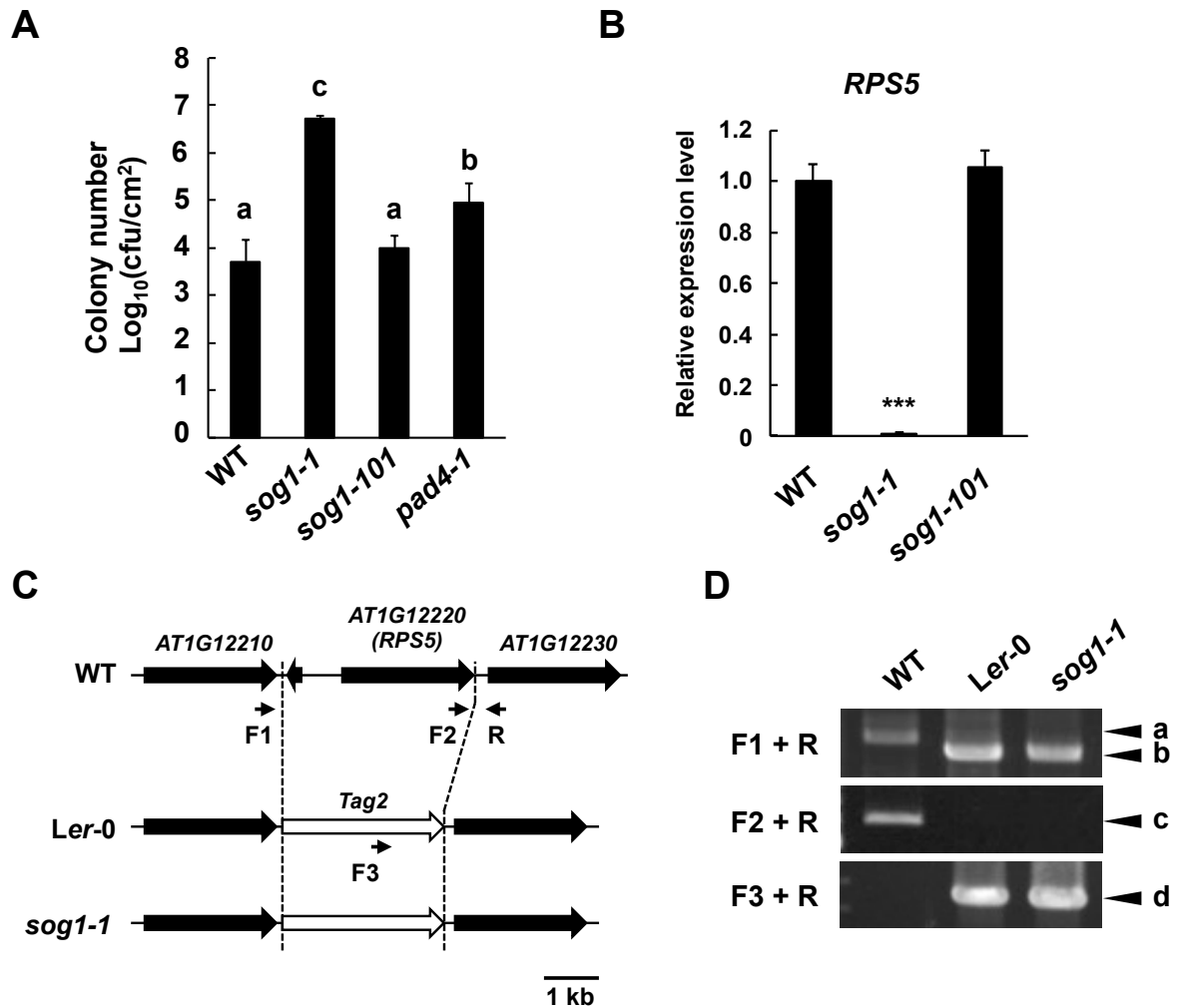


図 21. *sog1-1* は *AvrPphB* エフェクターの認識に必要な *RPS5* 遺伝子を欠損する

(A) 発芽後 5 週間目の野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-101*、*pad4-1* の本葉に *Pst AvrPphB* を感染させ、接種後 3 日目の病原菌の数を測定した。平均値および標準偏差は独立した 3 回行い得た値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意味な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

(B) 野生型植物 (WT)、*sog1-1*、*sog1-101* での *RPS5* 遺伝子の発現量。定量 RT-PCR により定量し、*ACT2* との相対値で示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物の値と比較した (***) : $p < 0.01$ 、Student's t-test)。

(C) Col-0 (WT)、*sog1-1*、*Ler-0* の *RPS5* 遺伝子座の模式図を示す。大きい黒色の矢印はエキソンを、小さい黒色の矢頭は PCR に用いたプライマーの結合部位を表す。白色の矢印は *Tag2* トランスポゾンを示す。

(D) *sog1-1* は *RPS5* 遺伝子座を欠損する。Col-0、*Ler-0*、*sog1-1* のゲノム DNA を鋳型に、(C) で示したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。a は *RPS5* を含む 4707bp、b は *Tag2* トランスポゾンを含む約 3800 bp、c は 621 bp、d は約 1700 bp を示す。

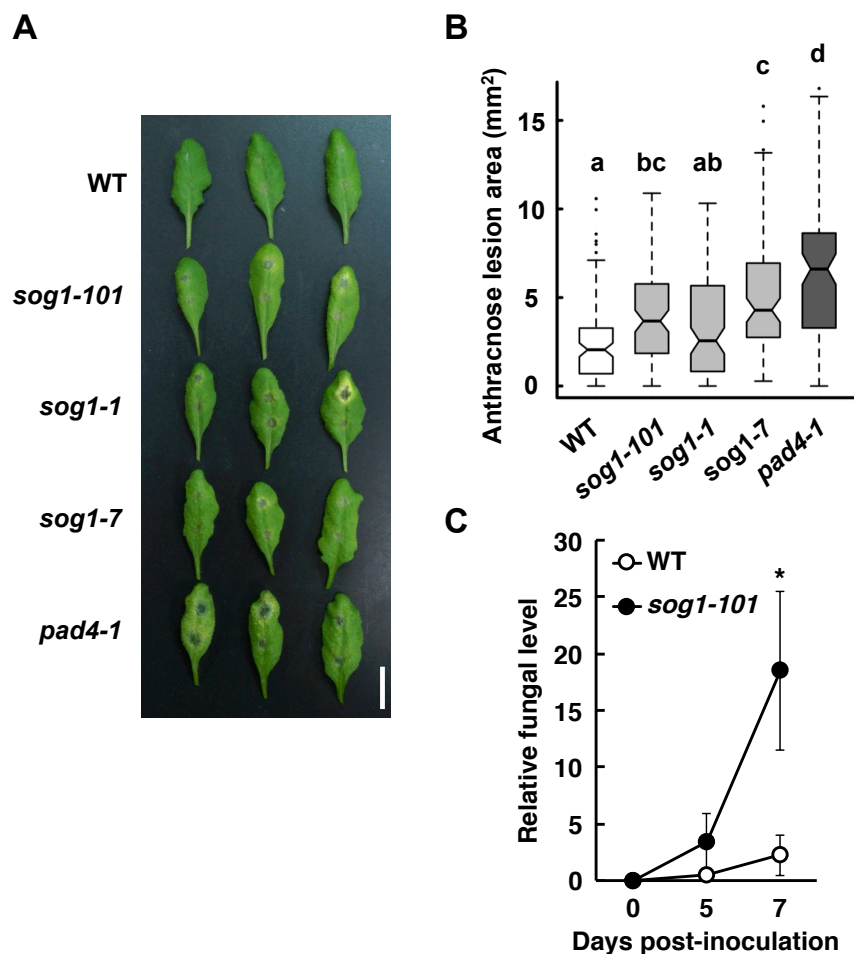


図 22. *sog1* 変異体はアブラナ科炭疽病菌 *C. higginsianum* に対して高い罹病性を示す

(A) *C. higginsianum* 感染後の野生型植物 (WT) および *sog1-101*、*sog1-1*、*sog1-7*、*pad4-1* の本葉。発芽後 5 週目の WT、*sog1-101*、*sog1-1*、*sog1-7*、*pad4-1* の本葉に、*C. higginsianum* の胞子を接種させ 6 日目の葉の病状を示す。スケールバーは 1 cm を表す。

(B) *C. higginsianum* の胞子を接種させ、6 日後の野生型植物 (WT) および *sog1-101*、*sog1-1*、*sog1-7*、*pad4-1* の本葉の病斑の面積を示す ($n \geq 96$)。各値のアルファベットが異なる場合、病斑の面積に統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$, one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

(C) 野生型植物 (WT) および *sog1-101* の本葉における *C. higginsianum* のバイオマス。*C. higginsianum* 接種後、0、5、7 日目 (dpi) の本葉から RNA を抽出し、定量 RT-PCR により *C. higginsianum* *ACT* (*ChACT*) の発現量を定量し、*A. thaliana* *ACT2* (*AtACT2*) の発現量に対する相対値で示す。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物と比較した (* : $p < 0.05$, Student's t-test)。

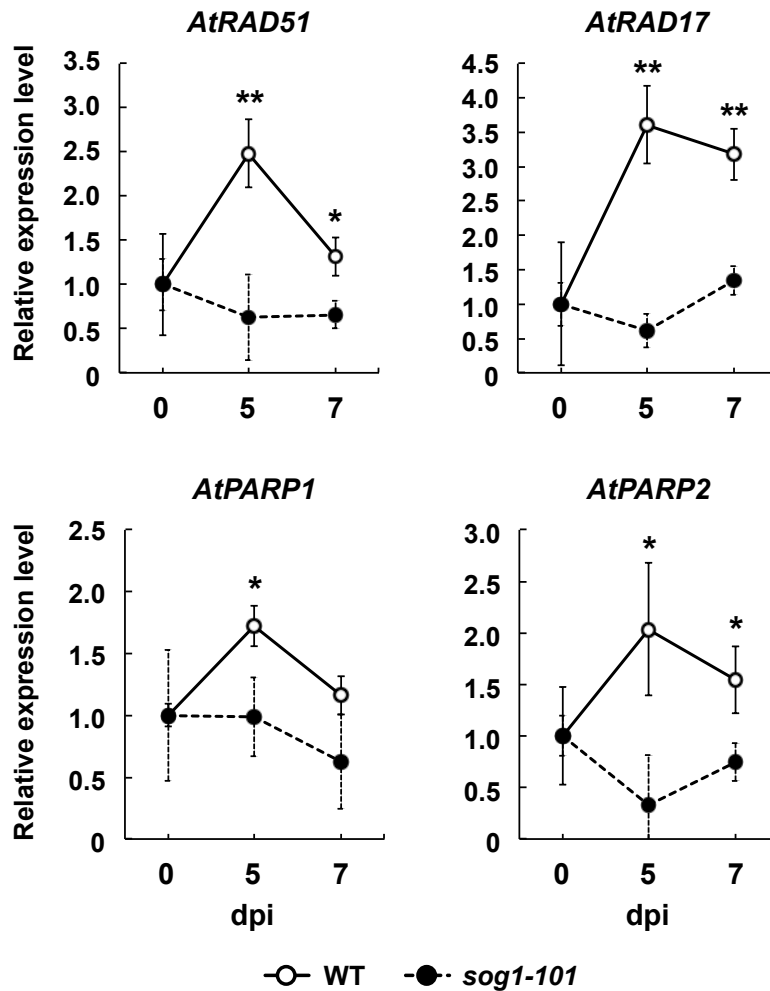


図 23. SOG1 は *C. higginsianum* 感染後の *AtRAD51*、*AtRAD17*、*AtPARP1*、*AtPARP2* の発現誘導に関与する

C. higginsianum 感染後の *AtRAD51*、*AtRAD17*、*AtPARP1*、*AtPARP2* の発現変化。発芽後 5 週間目の野生型植物 (WT) および *sog1-101* の本葉に、*C. higginsianum* を接種し、0、5、7 日目 (dpi) の本葉から RNA を抽出し、定量 RT-PCR により *AtRAD51*、*AtRAD17*、*AtPARP1*、*AtPARP2* の発現量を定量した。発現量は *ACT2* で標準化し、0 日目の発現量を 1 とした時の相対値で示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、*sog1-101* と比較した (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、Student's t-test)。

1-4. 考察

植物は成長過程において常に様々なストレスに曝されている。現在までに、浸透圧や乾燥、強光、重金属といった非生物ストレスや、病原菌感染などの生物ストレスによって DNA が損傷を受けることや (Hu *et al.*, 2016)、電離放射線や放射線類似薬剤によっても DNA 損傷が引き起こされることが知られている (Manova and Gruszka, 2015)。さらには、通常の染色体複製においても、しばしば DNA 複製エラーなどが起きることが報告されている (Hu *et al.*, 2016)。そして、細胞内で DNA 損傷が蓄積すると、ゲノムの安定性が失われ、染色体の欠損や転位をなどが引き起こされる場合もあることから、DNA 損傷応答はゲノムの恒常性を維持するために非常に重要な機構であると考えられる。

SOG1 および p53 は DNA 損傷に応答した細胞周期の停止に関与する

動物の DNA 損傷応答機構は盛んに研究されており、p53 転写因子を中心としたチェックポイント制御や、アポトーシスなどの分子機構が解明されつつある (Bode and Dong, 2004; Bieging *et al.*, 2014)。一方、植物の DNA 損傷応答は限られた知見しか得られておらず、特に、植物の DNA 損傷応答の中心的役割を果たしている SOG1 の下流でどのような分子機構が働くことで、DNA 損傷応答を引き起こしているのか不明な点が多かった。本研究では、マイクロアレイや ChIP-Seq による解析により、SOG1 の直接の標的候補遺伝子として 146 遺伝子を同定した (図 24)。それら遺伝子は、チェックポイントや細胞周期制御、DNA 修復、植物免疫応答、ROS の産生、そして植物ホルモンシグナリングに関与することが示唆されている (図 24)。さらに、SOG1 と p53 の標的遺伝子の GO 解析により、SOG1 と p53 は特に、細胞周期チェックポイントを活性化させる点において、共通の機能を有することが示唆された。

これまでに、SOG1 は DNA 損傷を受けると、すでに直接転写誘導することが報告されている CDK 阻害因子 *SMR5* および *SMR7* の他にも (Yi *et al.*, 2014)、本研究では新たに 3 つの CDK 活性の抑制に関与する遺伝子 (*SMR4*, *KRP6*, *WEE1*) を SOG1 の標的遺伝子として同定した (表 8)。SMR ファミリータンパク質は、細胞周期進行に必須な CDKA タンパク質と直接結合することで CDK 活性を低下させることが示されていることから (Van Leene *et al.*, 2010)、SOG1 は複数の *SMR* 遺伝子の転写を誘導することで、細胞周期の進行を抑制していると考えられる。また、*KRP6* は動物の CDK 阻害因子で知られる CIP/KIP ファミリータンパク質のオルソログとして考えられている (Wang *et al.*, 1997; De Veylder *et al.*, 2001)。実際、*KRP6* は CDKA だけでなく、G2/M 期移行に働く CDKB2;1 と直接結合することが知られており、G1/S 期および G2/M

期の進行停止に関わると予想されている (Nakai *et al.*, 2006; Guérinier *et al.*, 2013)。また、WEE1 キナーゼは CDK をリン酸化することにより、その活性を低下させることが予想されていることから (De Schutter *et al.*, 2007)、SOG1 は WEE1 を介して G2 期の進行抑制を制御する可能性が考えられる。さらに、SOG1 は DNA 損傷に応答して、M 期サイクリン遺伝子の発現低下や CDKB2 タンパク質の分解制御にも働いていることが報告されている (Adachi *et al.*, 2011)。以上の結果から、SOG1 は DNA 損傷に反応して、CDK のリン酸化制御やタンパク質分解、CDK 阻害因子の転写制御といった多面的な制御を行うことで CDK 活性を抑制し、細胞周期を停止させていることが示唆された。一方で、p53 も細胞周期の進行を負に制御する因子の遺伝子発現を活性化させることが報告されている。例えば、p53 は CDK 阻害因子である p21^{Cip1/Waf1} をコードする *CDKN1A* の発現を直接的に、p57^{Kip2} および p16^{INK4a} をコードする *CDKN1C* および *CDKN2A* の発現を間接的に誘導することで G1/S 期そして G2/M 期の移行を阻害している (表 8) (Donjerkovic and Scott, 2000; Taylor and Stark, 2001; Sadasivam and DeCaprio, 2013)。他にも、p53 の下流で、G2 期から M 期への進行時にサイクリン B および CDK1 の遺伝子発現を誘導することで知られる MYBL2 (B-MYB) をコードする遺伝子の転写が抑制される (Sadasivam and DeCaprio, 2013, Kenzelmann Broz *et al.*, 2013)。加えて、p53 は G1 期から S 期にかけて CDK の活性化に関わる *CDC25A* を間接的に、M 期 CDK を活性化する *CDC25C* を直接的に発現抑制することも知られている (Clair *et al.*, 2004; Rother *et al.*, 2007)。そのことから、p53 も CDK 活性を転写レベルおよびタンパク質レベルで抑制することで、細胞周期の進行を阻害する。以上の結果から、DNA 損傷に反応した細胞周期の停止に、SOG1 と p53 はどちらも重要な役割を果たしていることが示唆された。

SOG1 と p53 は異なる DNA 修復経路を活性化させることにより、ゲノム DNA の恒常性維持に寄与する

SOG1 標的遺伝子を用いた GO 解析から、「double-strand break repair」の GO タームが有意に濃縮していることが明らかとなった。DNA 二本鎖切断の修復は、相同組換えと非相同末端結合の二種類に大きく分けられるが、動物の相同組換え経路に関わる遺伝子のオルソログが、SOG1 の標的遺伝子として多数同定された (*CtIP/RBBP8*、*RPA*、*RFC*、*RAD17*、*BRCA1*、*RAD51*、等) (表 8)。したがって、SOG1 は DNA 損傷に反応して、相同組換えを介した DNA 修復経路の活性化に関わることが示唆される。一方で、p53 の標的遺伝子においては、DNA 修復関連の GO タームは濃縮されなかったが、いくつかの DNA 修復遺伝子 (*MutS homolog 6 (Msh6)*、*Excision repair cross-complementation group 5 (Ercc5/Xpg)*、*DNA polymerase kappa (Polk)*、*DNA*

polymerase epsilon, catalytic subunit (Pole)、*RecQ like helicase (Recql)* が、p53 依存的に発現が誘導されることが報告されている (表 8)。*MutS homolog 6 (Msh6)* は DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair: MMR) を、*Excision repair cross-complementation group 5 (Ercc5/Xpg)* や *DNA polymerase kappa (Polk)* はヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) を、*DNA polymerase epsilon, catalytic subunit (Pole)* や *RecQ like helicase (Recql)* は、MMR や NER に加え、塩基除去修復 (base excision repair: BER) といった修復経路に幅広く関わる (Bouwman and Jonkers, 2012; Croteau *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2015)。興味深いことに、相同組換えに関わる因子は、p53 によって転写誘導されない (Arias-Lopez *et al.*, 2006; McDade *et al.*, 2014)。以上のことから、SOG1 と p53 はいずれもゲノム恒常性の維持に寄与することが考えられるが、それらが活性化させる DNA 修復経路は異なっていることが示唆された。

DNA 損傷に応答して SOG1 と p53 は異なるメカニズムにより細胞死を誘導する

動物細胞では、DNA 損傷が高蓄積すると、プログラム細胞死が起きることで、損傷を受けた細胞が積極的に除去される。これは、腫瘍形成の抑制に重要な制御系であることが知られている (Chipuk and Green, 2006)。そして、アポトーシスの過程では、システインプロテアーゼであるカスパーゼ群が重要な役割を担うことが報告されている (Tait and Green, 2010)。現在までに、p53 はアポトーシスの促進に関わる複数の因子 (*BCL2 associated X protein (Bax)*、*BCL2 binding component 3 (Bbc3/Puma)*、*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Pmaip1/Noxa)*、*Fas cell surface death receptor (Fas)*、等) の発現誘導に関与することが知られている。内因性のアポトーシス経路の誘導には、カスパーゼ群の活性化に必要なシトクロムCをミトコンドリアから放出するミトコンドリア外膜透過 (mitochondrial outer membrane permeabilization: MOMP) を引き起こすことが重要であるが、Bax はその MOMP を促進するエフェクタータンパク質である。さらに、Bbc3/Puma や Pmaip1/Noxa は MOMP の誘導のためにアポトーシスシグナルをエフェクタータンパク質に伝達するメディエーターとして働く。Fas レセプターは Fas リガンドを認識すると外因性アポトーシス経路を活性化させることで知られる (Tait and Green, 2010)。本研究でも、p53 標的遺伝子の GO 解析において、アポトーシス関連の GO タームが多く含まれていたことから (表 8)、p53 は DNA 損傷下でのプログラム細胞死の活性化に重要な役割を担っていると考えられる。一方、植物では DNA 損傷に応答した細胞死は幹細胞においてのみ起こる (Fulcher and Sablowski, 2009; Furukawa *et al.*, 2010)。この幹細胞の細胞死は、*sog1* 変異体では起きないことから、SOG1 を介した DNA 損傷応答シグナルが細胞死の誘導に必要であると考えられる (Furukawa *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013)。興味深いこ

とに、動物のアポトーシスに必須なカスパーゼ遺伝子は、後生動物で広く保存されているが、植物にはカスパーゼ遺伝子のオルソログが存在しない。代わりに、植物はシステインプロテアーゼであるメタカスパーゼを保持していることが明らかになっている (Lam and Zhang, 2012)。メタカスパーゼはカスパーゼと似た構造をもっているが、カスパーゼと異なる生化学的性質を示す (Vercammen *et al.*, 2004; Watanabe and Lam 2005)。シロイヌナズナのタイプ II に属するメタカスパーゼ遺伝子 *AtMC8* の発現は酸化ストレスで誘導され、*atmc8* 変異体では UV-C および過酸化水素によって誘導される細胞死が抑制されることが報告されている (He *et al.*, 2008)。しかしながら、*atmc8* 変異体はゼオシン処理に対して野生型と同様の幹細胞死を示すことが知られている (Fulcher and Sablowski, 2009)。一方で、公開されているマイクロアレイデータによると、*AtMC8* 以外の他のメタカスパーゼ遺伝子も DNA 二本鎖切断によって発現が誘導される傾向にあることから (例えば、*AtMC1* および *AtMC2* は地上部で、*AtMC6* は根において、ブレオマイシンおよび MMC の同時処理から 12 時間後に発現レベルが 1.5~2 倍程度上昇する)、複数のメタカスパーゼ遺伝子が SOG1 の下流で働くことにより、DNA 二本鎖切断による細胞死を誘導している可能性も考えられる。

SOG1 はスパーサーを含むパリンドロミックな CTT(N)₇AAG 配列に結合する

SOG1 は ATM および ATR にリン酸化されることで活性化状態となり、下流の遺伝子の転写を誘導している (Yoshiyama *et al.*, 2013; Sjogren *et al.*, 2015)。実際、SOG1 の C 末端領域に存在する 5 箇所の SQ モチーフのうちいずれか、または全てを ATM がリン酸化することを *in vitro* キナーゼアッセイにより調べられており、植物体内においても SOG1 がこれらの SQ モチーフを介して DNA 損傷依存的にリン酸化されることを Phos-tag 電気泳動法により確認されている (Yoshiyama *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2014)。そして、SOG1 標的遺伝子の発現誘導は SOG1 の SQ モチーフへの変異導入によって欠損することも報告されている (Yoshiyama *et al.*, 2013; Yoshiyama *et al.*, 2017)。しかしながら、この SQ モチーフにおけるリン酸化が SOG1 の転写機能をどのように制御しているのかは明らかにされていなかった。本研究では、DNA 損傷を受けていない時の SOG1 や、非リン酸化型の SOG1 が、標的 DNA 配列に結合しないことを明らかにした。NAC 型転写因子の中で、リン酸化による機能的制御を受けることが報告された例は少ない。よく調べられているものとしては、イネの植物免疫で過敏感反応を制御する OsNAC4 が挙げられる。OsNAC4 はリン酸化を受けることにより、核内へ移行し転写制御が可能となる (Kaneda *et al.*, 2009)。一方、SOG1 タンパク質については、通常時においても核内に局在していることから (Yoshiyama *et al.*, 2013)、SOG1 は核内で ATM または ATR によってリン酸化されることにより標的配列に結合すると考え

られる。さらに、BiFC アッセイにより、SOG1 はリン酸化に依存して SOG1 同士で相互作用する様子が観察されたことから、SOG1 はホモ複合体を形成することによりスペーサーを含むパリンドロミックな配列を認識する可能性が考えられる (図 24)。SOG1 の他に NAC 型転写因子である ANAC001 や ANAC019、VOZ2 などホモ二量体を形成することで、スペーサーを含むパリンドロミックな配列を認識することが知られている (Xie *et al.*, 2000; Ernst *et al.*, 2004; Mitsuda *et al.*, 2004)。しかし、これらのホモ複合体形成がリン酸化によって制御される例は未だ報告されていない。SOG1 がこのような機能制御機構を有しているのかどうかを明らかにするためには、DNA 損傷依存的なリン酸化によって SOG1 がホモ複合体形成するのかわかるプルダウン法によって確認し、また、複合体形成に必要なドメインを同定して複合体形成しない変異型 SOG1 を植物体で発現させた時に、その変異型 SOG1 が標的プロモーターに結合が可能であるのかどうかを ChIP-PCR によって検証する必要がある。

本研究により、SOG1 は CTT(N)₇AAG を含む配列に直接結合することを明らかにした。さらに、SOG1 標的遺伝子の多くは、プロモーター領域に CTT(N)₇AAG 配列を含んでいることが示された。そのことから、SOG1 は CTT(N)₇AAG 配列を介して、これらの標的遺伝子の転写誘導を行っていることが考えられる。一方で、146 個の SOG1 標的候補遺伝子の中で、72 個の遺伝子 (*AtRAD17*, *TRFL10*, *SYN2*, *POLD4*, *UBP21*, 等) は、SOG1 がプロモーター領域に結合するにも関わらず、CTT(N)₇AAG 配列を有していなかった。このことから、SOG1 による CTT(N)₇AAG 配列の認識において、数塩基の違いは許容される可能性が考えられる。また、NAC 型転写因子は他の転写因子とヘテロ複合体を形成することにより、DNA への結合様式が変化することも報告されている。例えば、ANAC096 は bZIP 型転写因子である ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 2 (ABF2) や ABF4 と相互作用することで、その標的である ABA 応答遺伝子の発現を制御することが知られている (Xu *et al.*, 2013)。したがって、SOG1 は他の転写因子とヘテロ複合体を形成することで、CTT(N)₇AAG 配列とは異なる DNA 配列に結合する可能性も考えられる。

SOG1 は MTI、ETI、サリチル酸シグナルを活性化させることにより病原菌感染に対する抵抗性の獲得に関与する

本研究では、SOG1 が病原真菌である *C. higginsianum* に対する防御応答に関与していることを明らかにした。さらに、SOG1 の標的遺伝子で、植物免疫応答への関与が近年報告された DNA 修復関連遺伝子 *AtRAD51*, *AtRAD17*, *AtPARP1*, *AtPARP2* の発現レベルが病原真菌感染後に SOG1 依存的に発現誘導されることから、病原真菌の感染によって SOG1 を介したシグナル系が活性化することが示唆された。C.

higginsianum は半生体栄養性 (hemibiotrophic) 病原菌であり、感染様式として生体栄養性 (biotrophic) フェイズと壊死栄養性 (necrotrophic) フェイズに分けられる。前者では、胞子から付着器を表皮細胞に産生した後、第一菌糸を宿主の表皮細胞内に侵入させて生細胞から栄養を得て成熟する。そして、壊死栄養性フェイズに移行して、成熟した第一菌糸から複数の第二菌糸を隣接する細胞に伸ばし、細胞を壊しながら菌糸を拡大する (O'Connell *et al.*, 2012)。サリチル酸シグナルは主に生体栄養性フェイズの感染を抑制することが知られている (Glazebrook, 2005)。実際、生体栄養性の病原真菌である *Powdery mildew* はサリチル酸の生合成やそのシグナル系の変異体に高い感染性を示すが (Kuhn *et al.*, 2016)、壊死栄養性の病原真菌である *Botrytis cinerea* は示さない (Glazebrook, 2005)。本研究では、サリチル酸シグナルが欠損している変異体 *pad4-1* が *C. higginsianum* に対して非常に高い罹病性を示したことから、サリチル酸シグナルの活性化は *C. higginsianum* 感染に対する抵抗性の獲得に重要であると考えられる。本研究で同定した、SOG1 標的遺伝子の中には、MTI や ETI そしてその下流で働くサリチル酸シグナルの活性化に関与する因子が複数含まれていた。例えば、ポリ (ADP-リボース) 合成酵素である *AtPARP1* および *AtPARP2* は MAMPs を介した応答遺伝子の発現誘導に必要な因子として同定されている (Feng *et al.*, 2015)。また、CDK 阻害因子である SIM および SMR1 は、ETI を介したサリチル酸の蓄積とその結果引き起こされるプログラム細胞死の誘導に関与することが知られている (Wang *et al.*, 2014; Hamdoun *et al.*, 2016)。ETI を介したシグナルにおける SIM および SMR1 の詳細な機能は未だ不明な点が多いが、SOG1 は *SMR4*、*SMR5*、*SMR7* の発現誘導を介して、ETI 経路に影響を与えているのかもしれない。また、SOG1 は複数のサリチル酸シグナルに関わる遺伝子を標的とする (*SAG101*、*AtMYB44*、*WRKY50*、*FMO1*、等)。*SAG101* は、ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) の複合体パートナーとして、病原菌応答性のサリチル酸の生合成やそのシグナル系の活性化に寄与する (Feys *et al.*, 2005)。*AtMYB44* はサリチル酸の下流で *WRKY70* を直接誘導することで、*PRI* の遺伝子の発現を活性化する (Li *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2013)。*WRKY50* はオレイン酸の欠乏によるサリチル酸の蓄積に必須であり、サリチル酸シグナルを活性化する (Gao *et al.*, 2010)。*FMO1* は病原菌感染後、感染部位以外の組織におけるサリチル酸の蓄積に必須であり、全身性獲得抵抗性 (systemic acquired resistance: SAR) に関わる (Mishina and Zeier, 2006)。このことから、SOG1 はこれらの遺伝子の発現誘導を介して、サリチル酸シグナルを促進しているのかもしれない。さらに、相同組換えによる DNA 修復に重要な *AtRAD51* または *AtRAD17* の変異は病原細菌に対する抵抗性を低下させ、さらに *AtRAD51* が *PRI* の防御遺伝子の発現誘導を制御することが知られている (Wang *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013)。以上のことから、SOG1 は *C. higginsianum* が感染後に標的遺伝子の発現を誘導し、MTI、ETI、サリチル酸シグナルを活発化させ

ることで、生体栄養生フェイズにおける *C. higginsianum* の感染過程を阻害している可能性が考えられる。

興味深いことに、*Pst* DC3000 は宿主ゲノムに DNA 損傷を引き起こし、野生型よりも *atm atr* 変異体に高い感染性を示すことが報告されているが (Song and Bent, 2014)、本研究では、*sog1* 変異体の *Pst* DC3000 に対する罹病性は野生型と同程度であった。このことは、*Pst*DC3000 に対する抵抗性の獲得に重要な経路が ATM および ATR の下流で SOG1 と独立して存在する可能性を意味する。実際、ATM および ATR は DNA 損傷に応答して、SOG1 以外にも DNA 修復や DNA 複製、減数分裂、クロマチン構造制御に関わる因子をリン酸化し、その数は 100 因子を超える (Roitinger *et al.*, 2015)。そのうちのひとつである PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1) は SWR1 複合体の主要因子として、ヒストン H2A をヒストンバリエント H2A.Z に置き換えることにより、クロマチンの構造制御や安定性の維持、遺伝子発現制御に関与する。近年、PIE1 は防御応答遺伝子の発現制御に関与するために、*piel* 変異体は *Pst* DC3000 に対して野生型よりも高い罹病性を示すことが報告された (Berriri *et al.*, 2016)。したがって、PIE1 は ATM および ATR の下流で SOG1 とは別の経路で病原細菌に対する抵抗性の獲得に寄与する因子の候補として挙げられる。今後は、SOG1 のリン酸化レベルや SOG1 標的遺伝子の発現を指標に、病原菌感染後の SOG1 の活性化状態を病原菌の種別や感染ステージ別に整理することによって、植物免疫における SOG1 を介したシグナル系の役割を理解することが期待される。

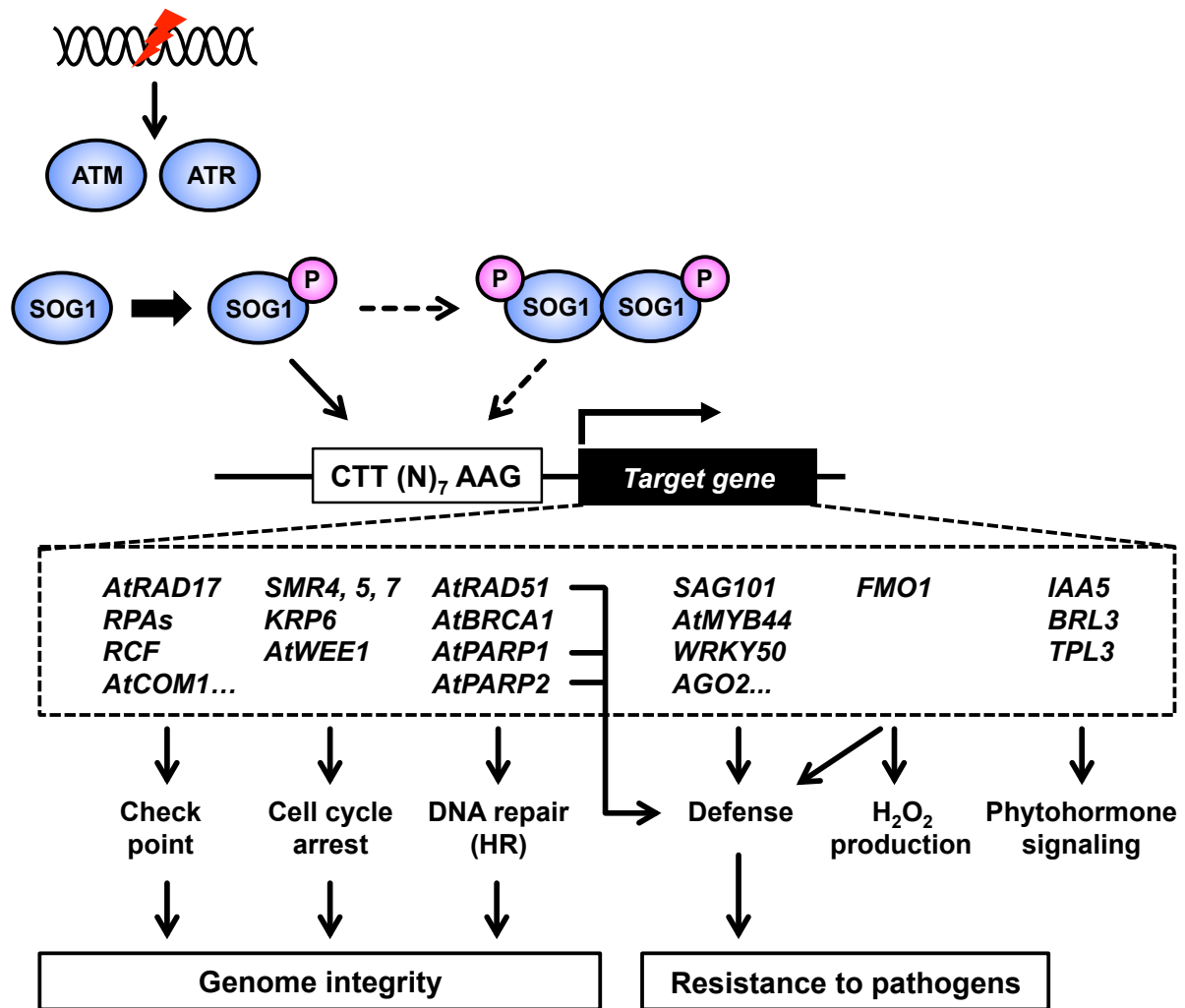


図 24. SOG1 による DNA 損傷応答シグナルのモデル

DNA 損傷が起こると、センサーキナーゼである ATM および ATR が SOG1 をリン酸化する。リン酸化された SOG1 は、おそらくホモ複合体を形成することにより、標的遺伝子プロモーター上にある CTT(N)₇AAG 配列を認識し結合する。そして、チェックポイントや細胞周期停止、DNA 修復に加え、植物免疫応答や H₂O₂ の産生、植物ホルモンシグナリングに関与する遺伝子の発現を誘導することにより、ゲノムの恒常性維持や病原真菌に対する抵抗性の獲得に関わる。

表 8. SOG1 制御遺伝子および p53 制御遺伝子の比較

<Cell cycle arrest>

SOG1-target			p53-target		
Gene	Direct	Function	Gene	Direct	Function
SMR7	Y	CDK inhibitor	Trp73	Y	TF
SMR5	Y	CDK inhibitor	Rprm	Y	G2/M
SMR4	Y	CDK inhibitor	Trp53inp1	Y	
ICK4/KRP6	Y	CDK inhibitor	Cdkn1a	Y	CDK inhibitor
WEE1	Y	Kinase	Apbb2	Y	
SIM	N	CDK inhibitor	Ak1	Y	
			Rb1	Y	G1/S
			Pml	Y	
			Bax	Y	proapoptotic gene
			Hras1	Y	
			Cgref1	Y	
			Thbs1	Y	
			Cdkn1c	N	CDK inhibitor
			AY074887	N	
			Cdkn2a	N	CDK inhibitor
			Pmp22	N	
			Rassf1	N	

<DNA repair>

SOG1-target			p53-target		
Gene	Direct	Function	Gene	Direct	Function
AtTK1A	Y		Tex15	Y	
AtBRCA1	Y	HR	Hspa1a	Y	
AtRAD51	Y	HR	Ercc5	Y	NER
AT5G48720	Y		Msh6	Y	MMR
AtPARP2	Y	HR/B-NHEJ	Cep164	Y	
AtCOM1/AtCtIP	Y	HR	Polk	Y	polymerase
TSO2	Y		H2afx	Y	signaling
AtRAD21.1/SYN2	Y	HR	Fto	Y	
AtRecQI3	Y	helicase	C77370	N	
AtMND1	Y	HR	Pole	N	polymerase
AtRAD17	Y	HR	Cetn2	N	
AtPARP1	Y	HR/B-NHEJ	Mbd4	N	
GMI	Y	HR	Ccno	N	
AT1G51130	Y		Brcc3	N	signaling
AtPOL2A	Y	polymerase	Polg2	N	polymerase
AtPOLD4	Y	polymerase	Chek2	N	signaling
AtRPA1C	Y	HR	Recql	N	helicase
AT1G49980	Y	polymerase	Ino80b	N	
AtRFC1	Y	HR	Rpa1	N	HR
AtRPA1A	Y	HR	Trim28	N	
AtRAD54	N	HR	Pold1	N	polymerase
AT1G02670	N		Apex1	N	
CHR8	N		Apitd1	N	
			Tdp1	N	
			Ung	N	
			Parp2	N	
			Pif1	N	

表 8. SOG1 制御遺伝子および p53 制御遺伝子の比較 (続き)

<Apoptotic signaling pathway>					
SOG1-target			p53-target		
Gene	Direct	Function	Gene	Direct	Function
	(not applicable)		Trp73	Y	signaling
			Pmaip1	Y	proapoptotic gene
			Tnfrsf18	Y	proapoptotic gene
			Fas	Y	proapoptotic gene
			Perp	Y	proapoptotic gene
			Ppm1f	Y	
			Eda2r	Y	
			Dapk1	Y	proapoptotic gene
			Cdkn1a	Y	CDK inhibitor
			Ei24	Y	
			Bbc3	Y	proapoptotic gene
			Ddit4	Y	
			Zfp385a	Y	
			Tnfrsf10b	Y	proapoptotic gene
			Foxo3	Y	
			Msh6	Y	MMR
			Epha2	Y	
			Siva1	Y	proapoptotic gene
			Pml	Y	
			Bax	Y	proapoptotic gene
			Hras1	Y	
			Ier3	Y	
			Trib3	Y	
			Ifnz	N	
			Cd40	N	
			Tnfrsf21	N	
			Mbd4	N	
			Sod2	N	
			Hmox1	N	
			AY074887	N	
			Ikbke	N	
			Chek2	N	
			Ero1l	N	
			Rnf41	N	
			Pnp1	N	
			Dedd2	N	
			Bok	N	
			Atf4	N	
			Vdr	N	
			Parp2	N	
			Xbp1	N	
			Chac1	N	

SOG1 および p53 が制御する遺伝子の中で、「cell cycle arrest」および「DNA repair」、「apoptotic signaling pathway」の GO タームに属する遺伝子をまとめた。それぞれの発現制御が直接的か (Y)、または間接的か (N)、も示す。各遺伝子の機能に関する略語は次の通りである。HR : homologous recombination、NHEJ : non-homologous end-joining、NER : nucleotide excision repair、MMR : mismatch repair。なお、赤字の遺伝子は最新のアンノテーションファイルにおいて、「cell cycle arrest」に属さないが、CDK 阻害因子をコードするため、「cell cycle arrest」に属するとした。

第 2 章

ANAC044 および ANAC085 の DNA 損傷応答における役割

2-1. 序論

DNA 二本鎖切断が起きると、植物では、茎頂分裂組織および根端分裂組織において、細胞周期を停止させる機構が働くことにより細胞分裂が抑えられる。例えば、 γ 線照射により DNA 二本鎖切断を引き起こすと、茎頂分裂組織においては細胞分裂が停止することで本葉の形成が抑えられる (Preuss and Britt, 2003)。さらに、G2 期の進行の指標となる遺伝子 (*CDKB2;1* および *KNOLLE*) の発現が照射後に一過的に低下する (Yoshiyama *et al.*, 2009)。一方、根端分裂組織では、ゼオシンにより DNA 二本鎖切断を引き起こされると、分裂領域が縮小し、結果的に著しい根の伸長阻害が見られる (Adachi *et al.*, 2011)。さらに、G2 期から M 期に発現する *CDKB2;1* タンパク質が積極的に分解されるとともに、M 期サイクリンの発現も低下することで、G2 期から M 期への進行が阻害される (Adachi *et al.*, 2011)。したがって、植物は DNA 二本鎖切断に応答して、G2 期チェックポイント機構を活性化させることにより、分裂細胞が M 期に進行することを積極的に抑制していることが考えられる。一方で、*sog1* 変異体では、野生型植物で見られる、上述の茎頂分裂組織や根端分裂組織での細胞周期抑制に関わる表現型の全てが抑圧される。そのことから、*SOG1* は DNA 損傷に応答した G2 期での細胞周期の進行停止に重要な役割を果たしていると考えられている (Adachi *et al.*, 2011)。しかし、*SOG1* がどのように M 期への進行を阻害しているのかについては不明な点が多い。

γ 線照射やゼオシン処理により、シロイヌナズナに DNA 二本鎖切断を引き起こすと、花芽分裂組織および根端分裂組織などの幹細胞で選択的に細胞死が引き起こされることが報告されている (Fulcher and Sablowski, 2009)。この表現型は、*atm*、*atr*、*sog1* 変異体において抑圧されることから、ATM/ATR-*SOG1* 経路が幹細胞の細胞死の誘導に積極的に関与することが明らかにされている (Furukawa *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013)。さらに、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理すると、DNA 損傷下での幹細胞の細胞死が抑制されることから (Furukawa *et al.*, 2010)、ATM/ATR-*SOG1* 経路の下流で新規に合成されたタンパク質が幹細胞での細胞死の誘導に関与していると考えられる。しかし、*SOG1* の下流でどのような因子が働くことで幹細胞の細胞死が誘導されているのかは明らかにされていない。

SOG1 のような NAC 型転写因子は、多くの場合、N 末端領域に NAC ドメインを有している。また、*SOG1* は、他の NAC 型転写因子とは異なり、NAC ドメインよりもさらに N 末端側に N-terminally extended (NTE) ドメインと呼ばれる領域を有している。NAC ドメインは、約 150 個のアミノ酸からなり、5 つのサブドメイン (サブドメイン A、B、C、D、E) により構成される (Puranik *et al.*, 2012)。サブドメイン A、C、D は NAC 型転写因子間で高く保存されているが、サブドメイン B と E は保存性が低

く、NAC 型転写因子間での機能の多様性を生み出していると考えられている。サブドメイン A は ANAC019 の結晶構造解析の結果、ホモおよびヘテロ複合体形成に関わると考えられている (Ernst *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005; Welner *et al.*, 2012)。サブドメイン C および D は正電荷を帯びており、DNA との結合に重要であると考えられている (Puranik *et al.*, 2012)。実際、*sog1-1* 変異体では、点変異により、サブドメイン C 内の 155 番目のグリシン (G) がアルギニン (R) に置換されているが (Yoshiyama *et al.*, 2009)、この変異により、SOG1^{G155R} は標的遺伝子の一つである *AtBRCA1* 遺伝子プロモーターに結合できなくなることが調べられている (Sjogren *et al.*, 2015)。加えて、*sog1-7* 変異体ではサブドメイン E 内の 206 番目のセリン (S) がフェニルアラニン (F) に置換しているが、SOG1^{G155R} と同様に SOG1^{S206F} も *AtBRCA1* プロモーターに結合できないことから (Sjogren *et al.*, 2015)、SOG1 においてはサブドメイン E も DNA への結合に必須であると考えられる (Sjogren *et al.*, 2015)。また、多くの NAC 型転写因子はサブドメイン D に核移行シグナルを有するが、SOG1 はサブドメイン C に核移行シグナルを持つ (Puranik *et al.*, 2012; Sjogren *et al.*, 2015)。

現在までに、ANAC019 をはじめ、多数の NAC 型転写因子 (ANAC001、ANAC019、ANAC053、ANAC103、VND7、VOZ2、等) がホモ複合体を形成することが報告されている (Xie *et al.*, 2000; Mitsuda *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2008; Welner *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Gladman *et al.*, 2016)。第 1 章では、SOG1 タンパク質もリン酸化依存的にホモ複合体を形成する可能性が示された。一方、いくつかの NAC 型転写因子は、相同性の高い他の NAC 型転写因子とヘテロ複合体を形成することが知られている。例えば、導管分化に関わる VND7 は、VND1、VND2、VND3 と強い結合親和性があることが確認されている (Yamaguchi *et al.*, 2008)。また、ANAC053 と ANAC078 は、それぞれホモ二量体およびヘテロ二量体を形成し、26S プロテアソームを阻害したときのストレス応答を制御することが報告されている (Gladman *et al.*, 2016)。過去に報告された分子系統樹解析結果を見ると、SOG1 に最も相同性の高い因子として ANAC044 (AT3G01600) および ANAC085 (AT5G14490) が示されている (Ooka *et al.*, 2003)。しかし、SOG1 がこれらとヘテロ二量体を形成するのかは明らかにされていない。加えて、第 1 章で明らかにした 146 個の SOG1 標的遺伝子の中に *ANAC044* および *ANAC085* が含まれる (表 4)。しかし、両因子について解析された例は今までになく、これらの因子が DNA 損傷応答にどのような機能的役割をもつのかについては不明である。

第 2 章では、SOG1 の標的遺伝子である *ANAC044* と *ANAC085* の機能解析を行った。*ANAC044* と *ANAC085* 遺伝子は DNA 損傷に応答して SOG1 によって直接転写誘導され、根の伸長を指標とした機能欠損変異体の表現型解析から、*ANAC044* および *ANAC085* は SOG1 と同じ経路で DNA 損傷応答を正に制御することが明らかとなった。

加えて、根端分裂組織の表現型解析から、ANAC044 および ANAC085 は DNA 二本鎖切断に応答して、細胞周期の停止、および、幹細胞死の誘導を制御することが示された。さらに、ANAC044 と ANAC085 はホモ複合体およびヘテロ複合体を形成するだけでなく、SOG1 と直接相互作用する可能性が示された。また、ANAC044 および ANAC085 は、SOG1 の下流で制御される遺伝子の約 3 割もの遺伝子発現を制御することが明らかになった。

2-2. 材料と方法

植物材料

本研究では、シロイヌナズナ Col-0 を野生型として実験を行なった。T-DNA 挿入変異体 *anac044-1* (SAIL_1286_D02)、*anac044-2* (GABI_968B05)、*anac085-1* (GABI_894G04)、*anac085-2* (SALK_208662) は NASC より得た。*anac044-1* の *SOG1* 遺伝子座に挿入された T-DNA の確認には、表 9 に示したプライマー「*anac044_genotyping_LP*」および「*anac044_genotyping_RP*」、「*SAIL_T-DNA_LB*」を、*anac044-2* の確認には「*anac044_genotyping_LP*」および「*anac044_genotyping_RP*」、「*GABI_T-DNA_LB*」を、*anac085-1* の確認には「*anac085_genotyping_LP*」および「*anac085_genotyping_RP*」、「*GABI_T-DNA_LB*」を、*anac085-2* の確認には「*anac085_genotyping_LP*」および「*anac085_genotyping_RP*」、「*SALK_T-DNA_LB*」を用いた。*sog1-1* 変異体は、Yoshiyama ら (2009) で報告されているものを本研究で用いた。*sog1-101* 変異体は、第 1 章 (図 20) で単離したものをを用いた。

プロモーターレポーターラインの作出のため、*ANAC044* の翻訳開始コドンから上流約 2 kb のプロモーター領域を、野生型植物のゲノム DNA を鋳型に表 9 に示すプライマーを用いて増幅した。そして、PCR 産物を、BR 反応により pDONR221 (Invitrogen) にクローニングし、エントリークローンを得た。*ANAC044* プロモーターと *GUS* 遺伝子を融合したコンストラクトを作製するために、LR 反応により *ANAC044* プロモーターを pGWB3 (Nakagawa *et al.*, 2007) に導入した。その後、このコンストラクトを野生型植物に導入した。以上の植物への形質転換の方法については、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じ方法で行った。

植物の生育条件

種子は MS 寒天培地に播種後、暗所にて 2 日間、4 °C で低温処理した。その後、23 °C、連続光条件下において、培地を垂直に立てて生育させた。GUS 染色実験では、7 日目の植物を、ブレオマイシン (0.4 µg/mL) (Cayman Chemical) を含む MS 液体培地に移して処理した。根の伸長実験では、発芽後 5 日目の植物を、ブレオマイシンを含む MS 寒天培地に移し、その後の根の伸長を測定した。

多重配列アライメント解析

SOG1 および ANAC044、ANAC085 のアミノ酸配列情報は The Arabidopsis

Information Resorce (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)、および Arabidopsis Information Portal (Araport, <https://www.araport.org>) より入手し、多重配列アライメント解析プログラム「Clustal Omega」(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) を用いて解析を行った。得られた結果は、視覚化ツール「Multiple Align Show」(http://www.bioinformatics.org/sms/multi_align.html) を用いて視覚化した。この時、3者間で2つ以上の同一アミノ酸 (identical amino acids) が存在する場合には黒色で、類似アミノ酸 (similar amino acids) が存在する場合には灰色で表示した。類似アミノ酸の判断については使用したツールの標準の設定に従った (ILV/FWY/KRH/DE/GAS/P/C/TNQM)。

ChIP-PCR 法

ChIP は、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じ方法で行った。定量 PCR に用いたプライマーは、表 9 に示している。

定量 RT-PCR

定量 RT-PCR は、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じ方法で行い、表 9 に示したプライマーを用いて解析を行った。

GUS 染色

発芽後 7 日目の植物体を、ブレオマイシン (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む MS 液体培地で緩やかに旋回 (70 rpm) しながら、24 時間処理した。GUS 染色の実験手順については、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同様の方法で行った。

根の表現型の解析

発芽後 5 日目の野生型植物、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* を、ブレオマイシン (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む、もしくは、含まない MS 寒天培地に移した。根の伸長実験では、培地に移した後の 24 時間ごとの根の長さを、フリーソフトウェア「ImageJ」を用いて測定した。

根端分裂領域の測定では、ブレオマイシン処理後 24 時間後の根を、スライドグラス上の透明化液 [chloral hydrate : glycerol : dH₂O (8 g : 1 mL : 1 mL)] に封入し、微分干渉顕微鏡「Axioskop 2 Plus」(Zeiss) で観察および撮影を行った。その後、根端分

裂領域における皮層の細胞数を測定した。

細胞死については、ブレオマイシン処理から 24 時間後の根を Propidium Iodide (PI) で染色し、細胞死を示した個体の割合と死細胞の面積を定量することにより評価した。細胞死の観察および撮影には走査型共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 (Olympus) を用い、死細胞面積の定量に関してはフリーソフトウェア「ImageJ」を使用した。

BiFC アッセイ

BiFC コンストラクトを作製するため、ANAC044.1 および ANAC085.1 (図 26) の ORF を表 9 に示すプライマーを用いて増幅し、BP 反応により pDONR221 (Invitrogen) にクローニングした。クローニングしたエンタリークローンを Gateway ディスティネーションベクター pVN/gw または pVC/gw (Kakita *et al.*, 2007) と LR 反応させた。それにより、それぞれのコーディング領域の N 末端側に、蛍光タンパク質 Venus の N 末端側 (VN) または C 末端側 (CV) をインフレームで融合させた。作製したコンストラクトのプロトプラストへの導入から顕微鏡による蛍光タンパク質の観察までは、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じ方法で行った。

一過性発現系によるレポーター活性の測定

AtRAD51 プロモーターのレポーターコンストラクトや、sGFP および SOG1 のエフェクターコンストラクト、そしてリファレンスコンストラクトは、第 1 章で使用したものをを用いた。ANAC044 および ANAC085 のエフェクターコンストラクトは、ANAC044.1 または ANAC085.1 のエンタリークローンを pA35S (Endo *et al.*, 2015) と LR 反応することで、*CaMV35S* プロモーターの下流に *ANAC044.1* または *ANAC085.1* を融合した発現ベクターを得た。プロトプラストへの導入から fLUC および rLUC 活性の測定までは、第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じ方法で行った。

マイクロアレイおよび GO 解析

発芽後 5 日目の野生型植物、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* を、ブレオマイシン (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含むまたは含まない培地に移し、2 時間、または 10 時間後に根端 (先端から 0.5 cm) をサンプリングし、RNA を抽出した。その後のステップは第 1 章の「材料と方法」で記載した内容と同じく、理化学研究所の関原明博士との共同研究により行われた。発現変動遺伝子は、発現レベルがブレオマイシン処理前に比べて 2 回の独立した実験とも 2 倍以上増加もしくは減少した遺伝子として定義し、同定した。抽出

した遺伝子のアノテーション情報は、TAIR10を参照した。

GO解析は、Web上のプログラム「agriGO」(Du *et al.*, 2010)でANAC044およびANAC085に制御される遺伝子群をinputとして解析を行った。

表 9. 第 2 章で使用したプライマーリスト

プライマー名	配列 (5'→3')	使用目的
ANAC044-ChIP-F	CTCGAAGCTTAGGGTCGGAA	ChIP-PCR
ANAC044-ChIP-R	TGGAGTGAACGCGTGAAGAC	ChIP-PCR
ANAC085-ChIP-F	ACGTTAGCCAGTTGTGTTCTTG	ChIP-PCR
ANAC085-ChIP-R	ACGTGTGTGTTGATGAGCGG	ChIP-PCR
Mul-ChIP-F	GATTTACAAGGAATCTGTTGGTGGT	ChIP-PCR
Mul-ChIP-R	CATAACATAGGTTTAGAGCATCTGC	ChIP-PCR
ANAC044-P1	GAGCGCTAGAAAGGGAACGA	semi qRT-PCR
ANAC044-P2	GCTTCCATGCTTTCGTCGC	semi qRT-PCR
ANAC085-P3	AGCACACCGAAAAGTAGTAC	semi qRT-PCR
ANAC085-P4	CTTCAATAACACTCACATTCCC	semi qRT-PCR
ANAC044-qRT-F	GAGCGCTAGAAAGGGAACGA	qRT-PCR
ANAC044-qRT-R	CCCCGGAAGTACTCTCACCTTC	qRT-PCR
ANAC085-qRT-F	AGCACACCGAAAAGTAGTAC	qRT-PCR
ANAC085-qRT-R	CTTCAATAACACTCACATTCCC	qRT-PCR
ACT2-qRT-F	CTGGATCGGTGGTCCATTC	qRT-PCR
ACT2-qRT-R	CCTGGACCTGCCTCATCATA	qRT-PCR
anac044_genotyping_LP	GGTGCAAACAAAGATGGAGTG	Genotyping
anac044_genotyping_RP	CCAGCTTTTTCTTCTTCAGC	Genotyping
anac085_genotyping_LP	GAATGCGTCTCTGTCTTCAGC	Genotyping
anac085_genotyping_RP	TTCCATGATTAGGAATCGACG	Genotyping
SAIL_T-DNA_LB	TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC	Genotyping
GABI_T-DNA_LB	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	Genotyping
SALK_T-DNA_LB	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Genotyping
ANAC44-attB1-F	aaaaagcaggcttcATGGCGAGGGCTTGGATTGTC	Cloning
ANAC44 Δ stop-attB2-R	agaaagctgggttAGTTCCATTGAATTTCCGAAAGT	Cloning
ANAC85-attB1-F	aaaaagcaggcttcATGAAAAGTCTACACAGGACTTG	Cloning
ANAC85 Δ stop-attB2-R	agaaagctgggttTGTTCTCACGGAAAAGTAAATCAGGG	Cloning
proANAC044-2k-attB1-F	aaaaagcaggcttcCCACAGAAGATGACTTGAAGACC	Cloning
proANAC044-attB2-R	agaaagctgggttGATTCCCAAAACAGAGAGAGGGG	Cloning

第 2 章の ChIP-PCR、定量および半定量 RT-PCR、ジェノタイピング、クローニングで使用したプライマーを示す。

2-3. 結果

SOG1 は DNA 損傷依存的に *ANAC044* と *ANAC085* の転写を誘導する

第1章の ChIP-Seq およびマイクロアレイ解析の結果から、SOG1 の標的候補遺伝子として *ANAC044* (*AT3G01600*) および *ANAC085* (*AT5G14490*) 遺伝子が同定された (表 4)。そこで、SOG1 結合配列である CTT(N)₇AAG が、*ANAC044* および *ANAC085* 遺伝子のプロモーター領域に存在するか調べたところ、転写開始点からそれぞれ 149 bp および 283 bp 上流にコンセンサス配列が存在することを見出した (図 15)。次に、SOG1 が *ANAC044* および *ANAC085* プロモーターに直接結合するか、ChIP-PCR により調べたところ、ゼオシンを処理していない時には SOG1 は *ANAC044* と *ANAC085* 遺伝子のプロモーターに結合しなかったが、ゼオシンを処理した植物では、有意に結合が確認された (図 25 A)。さらに定量 RT-PCR 法により、ゼオシンによる *ANAC044* と *ANAC085* の遺伝子発現変化を、野生型および *sog1-101* で調べたところ、両遺伝子は SOG1 依存的に発現誘導されることを明らかにした (図 25 B)。これらの結果から、*ANAC044* および *ANAC085* は、DNA 損傷存在下で SOG1 により直接転写誘導されることが明らかになった。

次に、*ANAC044* および *ANAC085* の DNA 損傷後の経時的な発現変化を追うために、DNA 二本鎖切断処理から 24 時間後までの転写産物量を定量 RT-PCR 法により定量した。近年、植物に対する DNA 二本鎖切断の処理にはゼオシンと同じ放射線疑似薬剤であるブレオマイシンがよく用いられるため、この実験以降の DNA 二本鎖切断処理にはブレオマイシンを使用した。その結果、DNA 損傷応答遺伝子である *AtRAD51* の発現と同様に、*ANAC044* および *ANAC085* の発現は DNA 損傷から 6 時間後に強く誘導され、その発現レベルは DNA 損傷から 6 時間後以降も維持されていた (図 25 C)。続いて、*ANAC044* 遺伝子の発現様式を調べるために、*ANAC044* のプロモーター領域 (開始コドンより上流約 2 kb) を単離し、*GUS* レポーターラインを作出した (*ProANAC044:GUS*)。発芽後、7 日目の植物を用いて *GUS* 発現を確認したところ、コントロール条件下では、茎頂分裂組織および若い本葉にのみ発現が観察された (図 25 D)。一方で、ブレオマイシンを処理すると、根の分裂組織や茎頂、若い本葉において *GUS* の発現誘導が観察された (図 25 D、E)。さらに、その発現はコントロール条件と比べ、強くなっていることが明らかとなった (図 25 D、E)。

ANAC044 および *ANAC085* は SOG1 と高い相同性を示す

NAC 型転写因子ファミリーの分子系統樹解析の結果から、SOG1 に最も似たアミノ

酸配列を有している NAC 型転写因子として、ANAC044 および ANAC085 が示されている (Ooka *et al.*, 2003)。また、シロイヌナズナのデータベース (TAIR および Araport) によると、ANAC044 および ANAC085 には複数のスプライシングバリエントが存在する (ANAC044.1、ANAC044.2、ANAC085.1、ANAC085.2、ANAC085.3、ANAC085.4) (図 26 A、図 27 A、C)。そこで、SOG1 および複数の ANAC044、ANAC085 バリエントのアミノ酸配列を比較した。ANAC044 の 2 つのバリエントにおける NTE ドメインおよび NAC ドメインは、同一のアミノ酸配列であった。また、ANAC085 の 4 種のバリエントも、ANAC085.1 および ANAC085.3 における開始コドン後の 4 アミノ酸 (KTLH)、および、ANAC085.2 および ANAC085.4 における開始コドン後の 1 アミノ酸 (E) を除くと、NTE ドメインおよび NAC ドメインは同一であった (図 26)。さらに ANAC044.1 および ANAC085.1 を例に挙げると、これらの NAC ドメインは SOG1 の NAC ドメインと 70 % を超える高い相同性を有していることがわかった (それぞれ 72.0 %、72.6 %)。また、NTE ドメインについては SOG1 と相同性が高いとは言えないものの (それぞれ、54.4%、44.1 %)、同程度のアミノ酸配列の長さを有していることがわかった (図 26)。また、ANAC044.1 および ANAC085.1 同士については、NTE ドメインおよび NAC ドメインにおいてそれぞれ 70 %、85 % を超える高い相同性があった。(図 26)。一方で、ANAC044 および ANAC085 の C 末端側の transcriptional regulatory (TR) ドメインと呼ばれる転写制御領域については、スプライシングによってアミノ酸配列が変化していた。そして、TR ドメインのアミノ酸配列の長さは、SOG1 に比べて、どの ANAC044 および ANAC085 のバリエントにおいても短かった (図 26)。加えて、SOG1 の TR ドメインには転写活性化に重要な ATM/ATR によるリン酸化部位 (SQ) が 5 箇所が存在するが、ANAC044 および ANAC085 の TR ドメインについては、ANAC044.1 のみに 1 箇所 (355-SQ-356) 存在するのみで、それ以外のバリエントには ATM/ATR リン酸化モチーフ (SQ または TQ) が存在しなかった (図 26 B)。以上の結果から、ANAC044.2 および ANAC085 の全てバリエントは SOG1 と異なり、ATM および ATR からリン酸化制御を直接受けないことが考えられた。

ANAC044 および ANAC085 は DNA 損傷応答を正に制御する

ANAC044 および ANAC085 は、DNA 損傷に応答して SOG1 に直接発現誘導されることや、SOG1 と相同性が高いことから、DNA 損傷応答において重要な役割を担う可能性が考えられた。そこで、ANAC044 および ANAC085 の DNA 損傷における役割を調べるために、これらの機能欠損変異体を単離し、DNA 損傷に対する表現型を解析した。ANAC044 および ANAC085 の機能欠損変異体は、シロイヌナズナの種子ストックセンターから 2 系統ずつ取得した。ANAC044 の T-DNA 挿入変異体である *anac044-1*

(SAIL_1286_D02)、*anac044-2* (GABI_968B05) は、それぞれ ANAC044.1 の翻訳開始コドンから 1105 塩基下流の第 4 エキソンと 1500 塩基下流の第 5 エキソンに T-DNA が挿入されており、ANAC044 遺伝子の発現を欠損していた (図 27 A、B)。また、ANAC085 の T-DNA 挿入変異体である *anac085-1* (GABI_894G04)、*anac085-2* (SALK_208662) は、それぞれ ANAC085.1 の翻訳開始コドンから 404 塩基および 637 塩基下流の第 3 エキソンに T-DNA が挿入されており、こちらも ANAC085 遺伝子の発現を完全に欠損していた (図 27 C、D)。

それら欠損変異体の DNA 損傷に対する感受性を調べるために、発芽後 5 日目の植物を、ブレオマイシンを含む培地に移し、その後の根の伸長を測定した。通常条件では、野生型植物および *sog1-101*、*anac044-1*、*anac044-2*、*anac085-1*、*anac085-2* において根の伸長に大きな差は観察されなかった (図 28 A)。しかし、ブレオマイシン存在下では、野生型植物が処理後 4 日目に根の伸長を停止するのに対し、*anac044-1*、*anac044-2*、*anac085-1*、*anac085-2* は *sog1-101* と同程度に根の伸長が維持された (図 28 A)。次に、ANAC044 および ANAC085 の遺伝学的関係性を調べるために、*anac044-1 anac085-1* 二重変異体を作成し、DNA 損傷に対する表現型を同様に観察した。その結果、ブレオマイシンに対する根の伸長抑制は、それぞれの単一変異体および *sog1-101* と同程度であることがわかった (図 28 B)。これらの結果から、ANAC044 と ANAC085 は、どちらも DNA 損傷応答に必要であると考えられた。

さらに、*sog1* 変異体と *anac044 anac085* 二重変異体との遺伝学的関係を調べるために、*sog1-101 anac044-1 anac085-1* 三重変異体を作成し、DNA 損傷に対する表現型を観察した (図 28 C)。ブレオマイシンを含む培地で生育させて根の伸長を測定したところ、*sog1-101* 変異体、*anac044-1 anac085-1* 二重変異体、*sog1-101 anac044-1 anac085-1* 三重変異体の間で、根の伸長において有意な差は観察されず、野生型植物で見られるような根の伸長抑制は示されなかった (図 28 C)。これらの結果から、SOG1 および、ANAC044、ANAC085 は同一の経路で働くことにより、DNA 損傷応答を正に制御していることが示唆された。

ANAC044 および ANAC085 は細胞周期の停止および幹細胞の細胞死の誘導に関わる

植物は DNA 損傷を受けると、頂端分裂組織や根端分裂組織において、SOG1 依存的に細胞周期の停止や幹細胞の細胞死などの DNA 損傷応答を引き起こすことが知られている (Preuss and Britt, 2003; Furukawa *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013)。そこで、ANAC044 と ANAC085 が、DNA 損傷に応答した細胞周期の停止や幹細胞の細胞死に関与しているのか調べるために、DNA 損傷下での *anac044-1 anac085-1* 二重変異体の

根端分裂組織の表現型を観察した。

はじめに、細胞周期の停止に ANAC044 と ANAC085 が関与しているのか調べた。現在までに、植物は DNA 損傷を受けると、G2 期で細胞周期が停止し、それにより DNA 倍加への移行の促進されることで、根端分裂組織の領域が縮小することが知られている (Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。そこで、根端分裂組織の皮層細胞における細胞数を測定することにより、ANAC044 と ANAC085 が DNA 損傷に応答した根端分裂組織の縮小に関わるかを調べた。その結果、通常条件においては野生型植物、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* の根端分裂組織の皮層細胞数に有意な差は見られなかった (図 29 A、B)。しかし、ブレオマイシンを 24 時間処理した野生型植物では根端分裂組織の皮層細胞数が 33 %減少したのに対し、*sog1-101* では 13 %、*anac044-1 anac085-1* では 17 %の減少に抑えられた。そして、*anac044-1 anac085-1* は、野生型および *sog1-101* と有意な差があることが明らかとなった (図 29 A、B)。この結果から、DNA 損傷に応じた SOG1 による細胞周期の停止や DNA 倍加の誘導に、ANAC044 および ANAC085 が部分的に関与することが示唆された。

次に、ANAC044 および ANAC085 が DNA 損傷に応じた幹細胞の細胞死に関与しているか調べた。野生型植物では、ブレオマイシンを 24 時間処理すると、全ての植物の根において幹細胞の細胞死が観察された。一方で、*sog1-101* および *anac044-1 anac085-1* では幹細胞の細胞死を示した個体は 20%程度であった (図 30 A、B)。さらに、細胞死を起こさなかった植物も含め、すべての植物の死細胞の面積の平均値を測定したところ、野生型植物では死細胞の面積が $922 \pm 474 \mu\text{m}^2$ であったのに対して、*sog1-101* および *anac044-1 anac085-1* はそれぞれ $24 \pm 37 \mu\text{m}^2$ 、 $7 \pm 20 \mu\text{m}^2$ であり、野生型植物と比べて有意な細胞死の抑制が認められた。また、*sog1-101* および *anac044-1 anac085-1* の間には有意な差は認められなかった (図 30 A、C)。以上の結果から、ANAC044 および ANAC085 は、SOG1 の下流で、幹細胞の細胞死の誘導に関わることが示唆された。

ANAC044 および ANAC085 は SOG1 標的遺伝子の発現誘導に関与しない

以前までの研究で、NAC 型転写因子は、相同性の高い他の NAC 型転写因子と NAC ドメインを介して二量体を形成することが報告されている (Yamaguchi *et al.*, 2008; Gladman *et al.*, 2016)。SOG1 および ANAC044、ANAC085 は、NAC ドメインの相同性が高いことから (図 26)、これらタンパク質も直接相互作用する可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証するために、BiFC アッセイによりこれらタンパク質間の相互作用を調べた。上述の通り、NAC ドメインは ANAC044 の 2 種のバリエーション間で、そして ANAC085 の 4 種のバリエーション間で非常に高く保存されていることから (図 26)、

ANAC044.1 および ANAC085.1 を例に SOG1 とのタンパク質間相互作用を BiFC アッセイにより解析した。野生型植物の本葉から単離したプロトプラストに、*SOG1*、*ANAC044.1*、*ANAC085.1* の BiFC コンストラクトを一過的に発現させ、これらタンパク質間の結合を調べたところ、*SOG1* と *ANAC044.1*、*SOG1* と *ANAC085.1*、*ANAC044.1* と *ANAC085.1* において結合が観察された (図 31)。さらには、*SOG1* と *SOG1*、*ANAC044.1* と *ANAC044.1*、*ANAC085.1* と *ANAC085.1* の相互作用も観察された (図 31)。そして、全ての結合は、細胞核と予想される場所で観察された。これらの結果から、*SOG1* および *ANAC044*、*ANAC085* は、植物細胞の核内で直接相互作用することで DNA 損傷応答を制御している可能性が示唆された。DNA 損傷下における *anac044-1 anac085-1* 二重変異体の表現型が *sog1-101* と類似していたことも考慮すると、*ANAC044* および *ANAC085* が *SOG1* に相互作用することで *SOG1* の標的遺伝子の発現制御に関与する可能性が考えられた。そこで、この可能性を調べるために、野生型植物、*anac044-1 anac085-1*、*sog1-1* にゼオシン処理し、複数の *SOG1* 標的遺伝子 (*AtRAD51*、*AtBRCA1*、*SMR5*) について定量 RT-PCR を行い、発現量の変化を調べた。その結果、*sog1-1* ではゼオシン処理による *AtRAD51*、*AtBRCA1*、*SMR5* 遺伝子の発現誘導が見られなかったが、*anac044-1 anac085-1* では、野生型植物と同程度に発現誘導が見られた (図 32 A)。また、*sog1-101* の葉のプロトプラストを用いた一過性発現系を用いて、*ANAC044* および *ANAC085* による *AtRAD51* プロモーターに対する転写活性を調べたところ、*ANAC044.1* および *ANAC085.1* を単独、または同時に過剰発現させても、*SOG1* で見られるような *AtRAD51* プロモーターの活性化は観察されなかった (図 32 B)。これらの結果から、*ANAC044* および *ANAC085* は *SOG1* の標的遺伝子の発現誘導に関与しない可能性が考えられた。

次に、*ANAC044* および *ANAC085* によって制御される遺伝子群を探索するため、野生型植物、*anac044-1 anac085-1*、*sog1-101* にブレオマイシンを処理し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。ブレオマイシン処理後、6 時間後に *ANAC044* および *ANAC085* が強く発現誘導されたため (図 25 C)、その前後 (ブレオマイシン処理から 2 時間後と 10 時間後) の根端を用いて実験を行った。初めに、*SOG1* の 146 個の標的遺伝子に着目し、これら遺伝子のブレオマイシンによる発現変動を二次元にプロットし、回帰分析を行った。その結果、ブレオマイシン処理から 2 時間後および 10 時間後ともに非常に高い線形性を示し (決定係数 $R^2 = 0.94$ および 0.86)、その回帰係数は 1 に近かった (0.98 および 0.94) (図 33 A)。*SOG1* の標的遺伝子の中でも、細胞周期の停止に関わる CDK 阻害因子 (*SMR4*、*SMR5*、*SMR7*、*KRP6*) の発現は、*anac044-1 anac085-1* において、野生型と同程度に誘導されていた (図 33 B)。また、当研究室で *SOG1* の下流で幹細胞特異的な細胞死に関わることを明らかにしているオーキシニンシグナルの抑制因子 *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 5 (IAA5)* の発現も、野生型

と同様に、*anac044-1 anac085-1* において誘導されていた (図 33 C)。以上の結果から、ANAC044 および ANAC085 は細胞周期の停止や幹細胞死の誘導に関わる SOG1 標的遺伝子の発現制御に関与しないことが確認された。

ANAC044 および ANAC085 は応答初期のサイクリン遺伝子の発現抑制に関与しない

現在までに、DNA 損傷が起きると、応答初期に SOG1 の下流で活性化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Act-MYB) である *MYB3R4* の発現が抑制されることにより、M 期サイクリンの遺伝子発現が低下することが知られている (Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。続いて、抑制化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Rep-MYB) である *MYB3R3* および *MYB3R5* タンパク質が安定化することにより、サイクリン遺伝子の発現がさらに抑制されることが示されている (Chen *et al.*, 2017)。そこで、ANAC044 および ANAC085 が DNA 損傷に応答したサイクリンの発現制御に関与しているか明らかにするために、全てのサイクリン遺伝子発現変化を調べた。野生型では、ブレオマイシン処理後 2 時間から 10 時間後にかけて、*CYCA1;1*、*CYCA2;2* などの A タイプサイクリンに加え、*CYCB1;1* および *CYCB2;5* を除く全ての B タイプサイクリン、そして *CYCD1;1* の発現が低下していた (図 33 D)。一方、*sog1-101* では、これらの発現減少は見られなかったことから、これらの制御は SOG1 下流で行われていると考えられる。興味深いことに、*anac044-1 anac085-1* では、野生型植物と同様に、これらサイクリン遺伝子の発現の低下が見られた (図 33 D)。また、*MYB3R4* の発現変化を調べたところ、*MYB3R4* の遺伝子発現は、野生型と同様に、*anac044-1 anac085-1* においても抑制されていた (図 33 E)。*MYB3R3* および *MYB3R5* の遺伝子発現については、過去の報告と同様に、DNA 損傷により変化は見られなかった (図 33 E) (Chen *et al.*, 2017)。以上の結果から、ANAC044 および ANAC085 は DNA 損傷応答初期のサイクリン遺伝子の発現抑制には関与しないことが示唆された。一方、CDK を始め、その他の細胞周期制御遺伝子の発現は、野生型においてもブレオマイシン処理によって影響を受けなかった (図 33 F)。

ANAC044 および ANAC085 は SOG1 が制御する遺伝子の約 3 割を制御する

ANAC044 および ANAC085 は、SOG1 依存的な DNA 損傷応答の一部の表現型を制御していることから、SOG1 によって転写制御される遺伝子群の一部を、ANAC044 および ANAC085 が制御している可能性が考えられた。そこで、マイクロアレイの結果を詳細に解析したところ、ブレオマイシン処理から 2 時間後において、SOG1 の下

流で制御される遺伝子は 457 個あり、その内の 36.5 %を占める 167 遺伝子は SOG1 および ANAC044/ANAC085 の両方によって活性化 (95 遺伝子) または抑制される (72 遺伝子) ことが明らかとなった (図 34 A、表 10)。一方、ブレオマイシン処理から 10 時間後においては、SOG1 依存的に発現変動する 517 遺伝子のうち、28.4 %にあたる 147 遺伝子が SOG1 および ANAC044/ANAC085 の両方によって活性化 (97 遺伝子) または抑制される (50 遺伝子) ことが明らかとなった (図 34 A、表 11)。さらに、DNA 損傷に応答して ANAC044 および ANAC085 が発現制御する遺伝子 (以下、ANAC044/085 制御遺伝子とする) について調べたところ、ブレオマイシン処理から 2 時間後および 10 時間後において多かったのは、タンパク質をコードする遺伝子であったが (それぞれ 71.9 %、86.4 %)、興味深いことにその次に大きく占めたのはトランスポゾン遺伝子で、ANAC044/085 制御遺伝子全体に対する割合はブレオマイシン処理より 2 時間後と 10 時間後でそれぞれ 18.0 %および 9.5 %であった (図 34 B)。これらのトランスポゾン遺伝子の中には、発現上昇するものと低下するもの両方が含まれていた (発現上昇および低下したトランスポゾン遺伝子数は、ブレオマイシン処理から 2 時間後にそれぞれ 12 個、18 個、そして、10 時間後にそれぞれ、8 個、6 個であった。)。次に GO 解析により、ANAC044/085 制御遺伝子がどの細胞プロセスに関わるのかを調べたが、有意に濃縮される GO タームを見出すことができなかった。そこで、細胞分裂に関連する遺伝子を ANAC044/085 制御遺伝子の中から個別に探索した。その結果、細胞分裂の活性化に関わる *ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR (ERF115)* (Heyman *et al.*, 2013) の発現が、ブレオマイシン処理から 10 時間後に ANAC044 および ANAC085 の下流で活性化されていた。一方、アクチンや細胞壁、植物ホルモンシグナリングの制御に関わる遺伝子が複数含まれていた。例えば、アクチンの形成に関わる *SUPPRESSOR OF cAMP RECEPTOR 4 / WASP FAMILY VERPROLIN HOMOLOGOUS PROTEIN 3 (SCAR4/WAVE3)*、*FORMIN HOMOLOGY PROTEIN 2 (AtFH2)*、*PROFILIN 3 (AtPRF3)* に加え (Zhang *et al.*, 2008; Thomas, 2012)、細胞壁の緩和に関わる *EXPANSIN A5 (EXPA5)*、*XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 28 (XTH28)* の発現は、ANAC044 および ANAC085 の下流で活性化されていた (Somssich *et al.*, 2016)。また、植物ホルモンシグナルと関連する因子として、アブジシン酸レセプターである *PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE 5 (PYL5)* は ANAC044 および ANAC085 の下流で発現誘導される一方で、*AUXIN RESPONSE FACTOR 10, 16, 17 (ARF10, 16, 17)* を標的とする microRNA や、サイトカイニン合成遺伝子である *LONELY GUY 3 (LOG3)* の発現は抑制されていた。さらに、タンパク質分解に関わる F-box 遺伝子が、ANAC044/085 制御遺伝子の中に複数含まれていた。

表 10. ANAC044 および ANAC085 に制御される遺伝子の一覧（ブレオマイシン処理 2 時間後）

AGI code	Type	Description	AGI code	Type	Description
AT1G02136	pseudogene	pseudogene of phagocytosis and cell motility protein	AT3G27450	pseudogene	
AT1G03103	protein_coding	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	AT3G27600	protein_coding	SWAP (Suppressor-of-White-APRicot)/surp RNA-binding domain-containing protein
AT1G05490	protein_coding	chromatin remodeling 31	AT3G29260	protein_coding	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT1G06260	protein_coding	Cysteine proteinases superfamily protein	AT3G30660	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G14720	protein_coding	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 28	AT3G30725	protein_coding	glutamine dumper 6
AT1G17830	protein_coding	Protein of unknown function (DUF789)	AT3G30832	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G19150	protein_coding	photosystem I light harvesting complex gene 6	AT3G32090	protein_coding	WRKY family transcription factor
AT1G19330	protein_coding		AT3G42475	protein_coding	
AT1G19380	protein_coding	Protein of unknown function (DUF1195)	AT3G44045	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G20590	protein_coding	Cyclin family protein	AT3G44117	pseudogene	
AT1G24520	protein_coding	homolog of Brassica campestris pollen protein 1	AT3G44212	pseudogene	
AT1G27890	protein_coding	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	AT3G46090	protein_coding	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
AT1G29360	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G48840	protein_coding	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT1G30920	protein_coding	F-box family protein	AT3G49610	protein_coding	Domain of unknown function (DUF313)
AT1G30975	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G50695	protein_coding	
AT1G34730	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G52350	protein_coding	D111/G-patch domain-containing protein
AT1G35035	protein_coding	Plant thionin family protein	AT3G54730	protein_coding	
AT1G35060	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G56250	protein_coding	
AT1G36200	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G57072	protein_coding	
AT1G36240	protein_coding	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	AT3G57370	protein_coding	Cyclin family protein
AT1G36910	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G61840	protein_coding	Protein of unknown function (DUF688)
AT1G40133	transposable_element_gene	transposable element gene	AT3G62820	protein_coding	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT1G42170	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G01520	protein_coding	NAC domain containing protein 67
AT1G47950	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G04430	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G48953	protein_coding		AT4G05350	protein_coding	RING/U-box superfamily protein
AT1G51530	protein_coding	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	AT4G06588	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G56400	protein_coding	F-box family protein	AT4G07736	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G56510	protein_coding	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	AT4G08670	protein_coding	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT1G58889	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G10670	protein_coding	GTC2
AT1G59660	protein_coding	Nucleoporin autopeptidase	AT4G11940	protein_coding	
AT1G61475	protein_coding	ATP binding; protein kinases	AT4G12190	protein_coding	RING/U-box superfamily protein
AT1G64260	protein_coding	MuDR family transposase	AT4G16162	protein_coding	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT1G64410	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G16355	other_rna	other RNA
AT1G64620	protein_coding	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	AT4G17718	protein_coding	Defensin-like (DEFL) family protein
AT1G73270	protein_coding	serine carboxypeptidase-like 6	AT4G18080	protein_coding	
AT1G78070	protein_coding	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	AT4G27160	protein_coding	seed storage albumin 3
AT1G80130	protein_coding	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT4G30730	protein_coding	
AT2G02135	pseudogene		AT4G30970	protein_coding	
AT2G03910	pseudogene		AT4G32370	protein_coding	Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G05040	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G32980	protein_coding	homeobox gene 1
AT2G06440	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G36100	protein_coding	Sec1/munc18-like (SM) proteins superfamily
AT2G07505	protein_coding	zinc ion binding	AT4G37490	protein_coding	CYCLIN B1;1
AT2G10050	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G37850	protein_coding	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT2G10390	transposable_element_gene	transposable element gene	AT5G06790	protein_coding	
AT2G11620	protein_coding		AT5G10090	protein_coding	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G13350	protein_coding	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	AT5G14100	protein_coding	non-intrinsic ABC protein 14
AT2G14200	transposable_element_gene	transposable element gene	AT5G14490	protein_coding	NAC domain containing protein 85
AT2G18600	protein_coding	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein	AT5G15140	protein_coding	Galactose mutarotase-like superfamily protein
AT2G18610	protein_coding		AT5G16350	protein_coding	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
AT2G20465	protein_coding	Molecular chaperone Hsp40/DnaJ family protein	AT5G17130	protein_coding	cysteine-type peptidases
AT2G21790	protein_coding	ribonucleotide reductase 1	AT5G28870	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G24720	protein_coding	glutamate receptor 2.2	AT5G28996	pseudogene	
AT2G25410	protein_coding	RING/U-box superfamily protein	AT5G30440	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G26740	protein_coding	soluble epoxide hydrolase	AT5G31702	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G27630	protein_coding	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein	AT5G31945	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G31380	protein_coding	salt tolerance homologue	AT5G32580	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G34360	protein_coding	MATE efflux family protein	AT5G34560	pseudogene	
AT2G34620	protein_coding	Mitochondrial transcription termination factor family protein	AT5G34707	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G36792	other_rna	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT2G36790	AT5G35148	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G37920	protein_coding	copper ion transmembrane transporters	AT5G38760	protein_coding	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
AT2G39820	protein_coding	Translation initiation factor IF6	AT5G38990	protein_coding	Malectin/receptor-like protein kinase family protein
AT2G42670	protein_coding	Protein of unknown function (DUF1637)	AT5G39861	pseudogene	
AT2G42860	protein_coding		AT5G40645	protein_coding	RPM1-interacting protein 4 (RIN4) family protein
AT2G44540	protein_coding	glycosyl hydrolase 9B9	AT5G40900	protein_coding	Nucleotide-diphospho-sugar transferase family protein
AT2G45740	protein_coding	peroxin 11D	AT5G41401	protein_coding	
AT2G46670	protein_coding	CCT motif family protein	AT5G41491	pseudogene	
AT3G01513	protein_coding		AT5G44760	protein_coding	C2 domain-containing protein
AT3G01600	protein_coding	NAC domain containing protein 44	AT5G45030	protein_coding	Trypsin family protein
AT3G05625	protein_coding	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT5G45307	mirna	MIR168/MIR168B; miRNA
AT3G07185	pre_rna	pre-tRNA	AT5G45630	protein_coding	Protein of unknown function, DUF584
AT3G08660	protein_coding	Phototropic-responsive NPH3 family protein	AT5G46845	mirna	MIR160/MIR160C (MICRORNA160); miRNA
AT3G09050	protein_coding		AT5G47950	protein_coding	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT3G10750	protein_coding	FBD domain family	AT5G48860	protein_coding	
AT3G11325	protein_coding	Phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	AT5G48890	protein_coding	C2H2-like zinc finger protein
AT3G14395	protein_coding		AT5G49920	protein_coding	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein
AT3G14450	protein_coding	CTC-interacting domain 9	AT5G50270	protein_coding	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein
AT3G14700	protein_coding	SART-1 family	AT5G52160	protein_coding	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT3G14735	small_nuclear_rna	U6-1; snRNA	AT5G56830	transposable_element_gene	transposable element gene
AT3G16040	protein_coding	Translation machinery associated TMA7	AT5G56990	protein_coding	
AT3G16770	protein_coding	ethylene-responsive element binding protein	AT5G57670	protein_coding	Protein kinase superfamily protein
AT3G221055	protein_coding	photosystem II subunit T	AT5G60615	protein_coding	Defensin-like (DEFL) family protein
AT3G22730	protein_coding	F-box and associated interaction domains-containing protein	AT5G63195	other_rna	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT5G63190
AT3G25573	protein_coding		AT5G65300	protein_coding	
AT3G27025	protein_coding				

表 11. ANAC044 および ANAC085 に制御される遺伝子の一覧 (ブレオマイシン処理 10 時間後)

AGI code	Type	Description	AGI code	Type	Description
AT1G02650	protein_coding	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT3G12981	pseudogene	
AT1G03055	protein_coding		AT3G14450	protein_coding	CTC-interacting domain 9
AT1G04457	pseudogene		AT3G14700	protein_coding	SART-1 family
AT1G05240	protein_coding	Peroxidase superfamily protein	AT3G21380	protein_coding	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT1G06250	protein_coding	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	AT3G28412	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G11362	protein_coding	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein	AT3G29030	protein_coding	expansin A5
AT1G12020	protein_coding		AT3G29260	protein_coding	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT1G14720	protein_coding	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 28	AT3G32032	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G16730	protein_coding	unknown protein 6	AT3G33103	pseudogene	
AT1G20350	protein_coding	translocase inner membrane subunit 17-1	AT3G35003	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G26570	protein_coding	UDP-glucose dehydrogenase 1	AT3G43402	protein_coding	
AT1G26799	protein_coding	Plant self-incompatibility protein S1 family	AT3G43684	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G27720	protein_coding	TBP-associated factor 4B	AT3G46110	protein_coding	Domain of unknown function (DUF966)
AT1G27730	protein_coding	salt tolerance zinc finger	AT3G48209	protein_coding	Plant thionin family protein
AT1G27820	protein_coding	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	AT3G48610	protein_coding	non-specific phospholipase C6
AT1G30920	protein_coding	F-box family protein	AT3G49950	protein_coding	GRAS family transcription factor
AT1G30974	protein_coding	Plant thionin family protein	AT3G50090	protein_coding	Exonuclease family protein
AT1G31040	protein_coding	PLATZ transcription factor family protein	AT3G55665	protein_coding	Plant self-incompatibility protein S1 family
AT1G33260	protein_coding	Protein kinase superfamily protein	AT3G57250	protein_coding	Emsy N Terminus (ENT) domain-containing protein
AT1G33607	protein_coding	Defensin-like (DEFL) family protein	AT3G57970	protein_coding	Emsy N Terminus (ENT)/ plant Tudor-like domains-containing protein
AT1G35230	protein_coding	arabinogalactan protein 5	AT3G61840	protein_coding	Protein of unknown function (DUF688)
AT1G35467	protein_coding	RALF-like 5	AT3G62499	protein_coding	YTH family protein
AT1G35910	protein_coding	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	AT3G62528	protein_coding	
AT1G36485	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G06588	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G41875	protein_coding		AT4G06591	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G46840	protein_coding	F-box family protein	AT4G06704	transposable_element_gene	transposable element gene
AT1G48590	protein_coding	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	AT4G09940	protein_coding	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT1G49100	protein_coding	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	AT4G10670	protein_coding	GTC2
AT1G49640	protein_coding	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	AT4G11460	protein_coding	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 30
AT1G57777	protein_coding	Protein of unknown function (DUF784)	AT4G11940	protein_coding	
AT1G58889	transposable_element_gene	transposable element gene	AT4G12800	protein_coding	photosystem I subunit I
AT1G59920	protein_coding	MADS-box family protein	AT4G16540	protein_coding	Heat shock protein HSP20/alpha crystallin family
AT1G61255	protein_coding		AT4G20250	protein_coding	
AT1G61470	protein_coding	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	AT4G21250	protein_coding	Sulfite exporter TauE/SafE family protein
AT1G61475	protein_coding	ATP binding;protein kinases	AT4G23770	protein_coding	
AT1G61480	protein_coding	S-locus lectin protein kinase family protein	AT4G28365	protein_coding	early nodulin-like protein 3
AT1G62900	protein_coding	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	AT4G31398	other_rna	Potential natural antisense gene, locus overlaps with AT4G31400
AT1G63210	protein_coding	Transcription elongation factor Spt6	AT4G34320	protein_coding	Protein of unknown function (DUF677)
AT1G68200	protein_coding	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	AT4G36430	protein_coding	Peroxidase superfamily protein
AT1G68290	protein_coding	endonuclease 2	AT4G37810	protein_coding	
AT1G69230	protein_coding	SPIRAL1-like2	AT5G01040	protein_coding	laccase 8
AT1G73680	protein_coding	alpha dioxygenase	AT5G01730	protein_coding	SCAR family protein 4
AT1G75600	protein_coding	Histone superfamily protein	AT5G05440	protein_coding	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT1G76840	protein_coding		AT5G05770	protein_coding	WUSCHEL related homeobox 7
AT1G77815	protein_coding		AT5G07310	protein_coding	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT1G78020	protein_coding	Protein of unknown function (DUF581)	AT5G07600	protein_coding	Oleosin family protein
AT1G80850	protein_coding	DNA glycosylase superfamily protein	AT5G08030	protein_coding	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
AT2G01610	protein_coding	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein	AT5G09360	protein_coding	laccase 14
AT2G01780	protein_coding	Curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	AT5G09805	protein_coding	inflorescence deficient in abscission (IDA)-like 3
AT2G01960	protein_coding	tetraspanin14	AT5G10340	protein_coding	F-box family protein
AT2G02290	protein_coding	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	AT5G11977	mirna	MIR156E; miRNA
AT2G04515	protein_coding		AT5G14490	protein_coding	NAC domain containing protein 85
AT2G05450	transposable_element_gene	transposable element gene	AT5G15140	protein_coding	Galactose mutarotase-like superfamily protein
AT2G11345	transposable_element_gene	transposable element gene	AT5G17340	protein_coding	Putative membrane lipoprotein
AT2G12195	transposable_element_gene	transposable element gene	AT5G17960	protein_coding	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G15860	protein_coding		AT5G18180	protein_coding	H/ACA ribonucleoprotein complex, subunit Gar1/Naf1 protein
AT2G17660	protein_coding	RPM1-interacting protein 4 (RIN4) family protein	AT5G20690	protein_coding	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT2G22060	protein_coding		AT5G23160	protein_coding	
AT2G25410	protein_coding	RING/U-box superfamily protein	AT5G34834	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G26440	protein_coding	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily	AT5G36140	protein_coding	cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 2
AT2G27535	protein_coding	ribosomal protein L10A family protein	AT5G41490	protein_coding	F-box associated ubiquitination effector family protein
AT2G28560	protein_coding	DNA repair (Rad51) family protein	AT5G41491	pseudogene	Pseudogene of AT2G38420; pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
AT2G37210	protein_coding	lysine decarboxylase family protein	AT5G42680	protein_coding	Protein of unknown function, DUF617
AT2G38230	protein_coding	pyridoxine biosynthesis 1.1	AT5G44760	protein_coding	C2 domain-containing protein
AT2G38340	protein_coding	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AT5G45400	protein_coding	Replication factor-A protein 1-related
AT2G39160	protein_coding		AT5G49520	protein_coding	WRKY DNA-binding protein 48
AT2G39820	protein_coding	Translation initiation factor IF6	AT5G52055	transposable_element_gene	transposable element gene
AT2G45940	protein_coding	Protein of unknown function (DUF295)	AT5G55240	protein_coding	ARABIDOPSIS THALIANA PEROXYGENASE 2
AT2G46400	protein_coding	WRKY DNA-binding protein 46	AT5G56600	protein_coding	profilin 3
AT3G01600	protein_coding	NAC domain containing protein 44	AT5G59990	protein_coding	CCT motif family protein
AT3G06020	protein_coding	Protein of unknown function (DUF3049)	AT5G64000	protein_coding	Inositol monophosphatase family protein
AT3G07540	protein_coding	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein	AT5G64450	protein_coding	
AT3G11773	protein_coding	Thioredoxin superfamily protein	AT5G66140	protein_coding	proteasome alpha subunit D2
AT3G12510	protein_coding	MADS-box family protein			

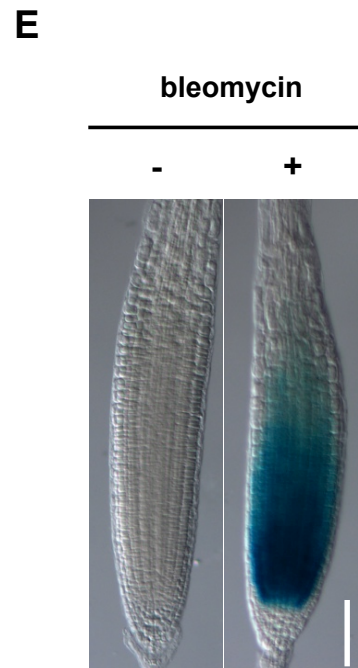
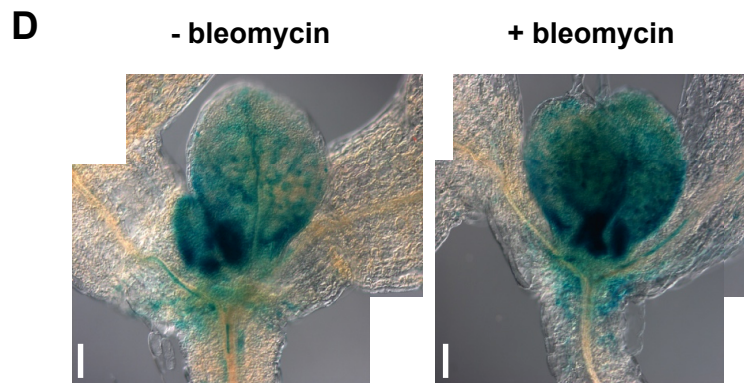
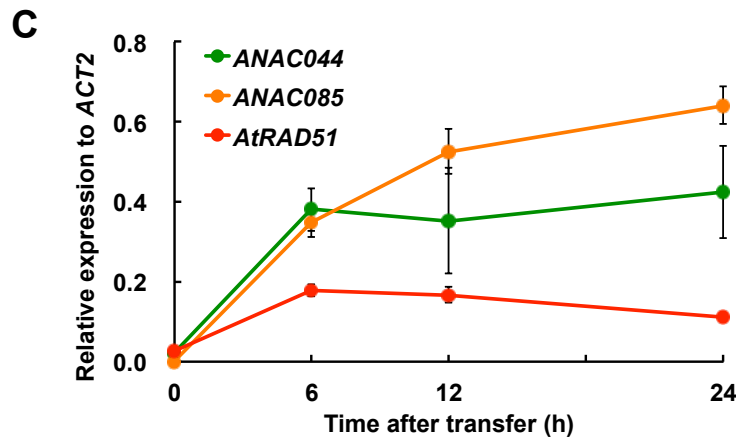
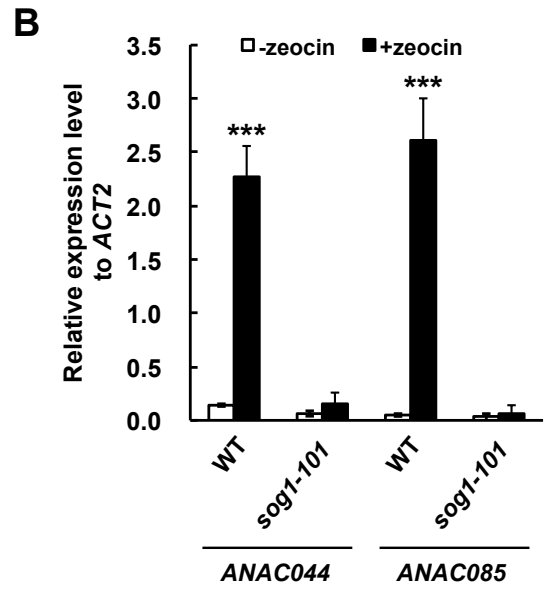
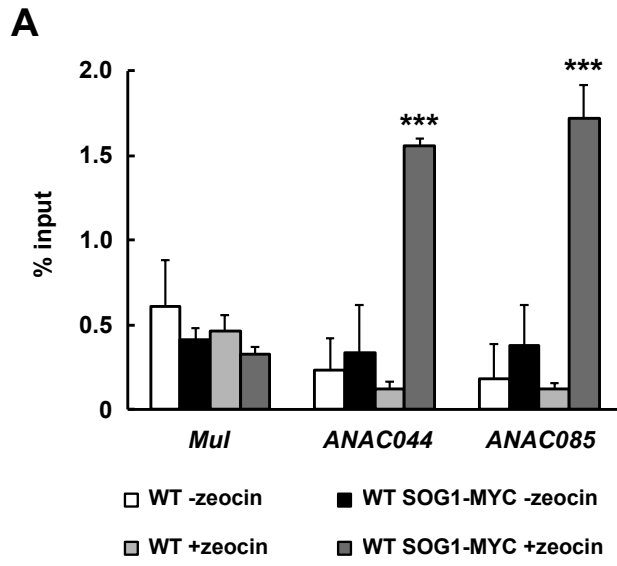


図 25. ANAC044 および ANAC085 は SOG1 の直接の標的遺伝子である

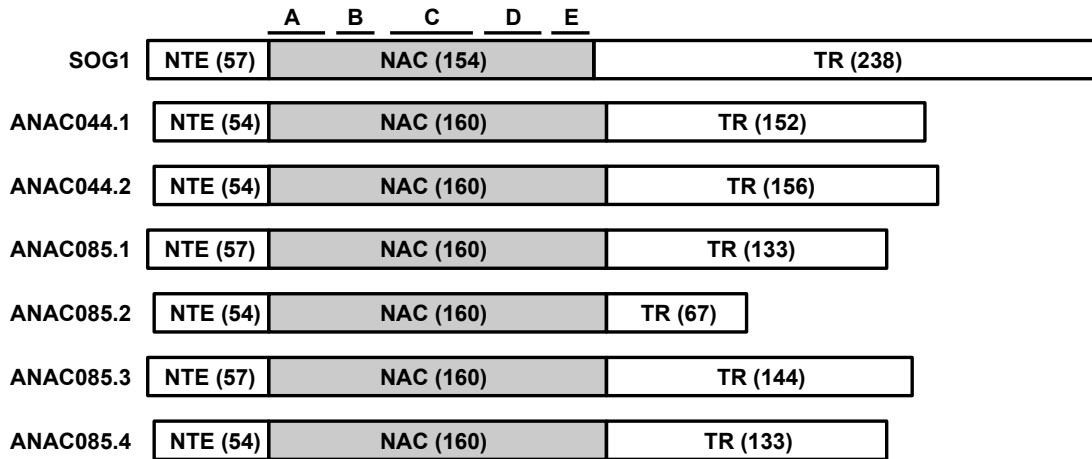
(A) 発芽後 2 週間目の *ProSOG1:SOG1-MYC* および野生型植物 (WT) を、15 μ M ゼオシンを含む (+zeocin) もしくは含まない (-zeocin) 培地で 2 時間処理し、その後、抗 Myc 抗体を用いて ChIP-PCR を行った。*Mul* はネガティブコントロールとして用いた。得られた値は input の値で標準化し、% input として表示した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、野生型植物の値と比較した (***) : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(B) (A) と同じ条件で処理した野生型植物 (WT) および *sog1-101* から得られた total RNA に対して定量 RT-PCR を行い、*ANAC044* および *ANAC085* の遺伝子発現量を定量した結果を示す。発現量は *ACT2* の発現量で標準化した値で表した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。有意差は、ゼオシン未処理の植物の値と比較した (***) : $p < 0.001$ 、Student's t-test)。

(C) 定量 RT-PCR を行い、根端における *ANAC044* および *ANAC085* 遺伝子のブレオマイシンによる DNA 損傷後の発現量を定量した結果を示す。*AtRAD51* は DNA 損傷応答遺伝子として実験系のコントロールとして用いた。発現量は *ACT2* の発現量で標準化して表した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。

(D、E) 発芽後 7 日目の *ProANAC044:GUS* を、0.4 μ g/mL ブレオマイシンを含む (+ bleomycin) もしくは含まない (- bleomycin) MS 液体培地に移し、24 時間処理した。GUS 染色後の茎頂分裂組織 (D)、根端分裂組織 (E) の写真を示す。スケールバーは 50 μ m を表す。

A



B

SOG1 --MAGRSWLIIDSNRIATKIMASASASSDPRQVWVWKSNPSSRHCPKQHVINDSDVVDVDDWPGLPRGVKFDPSD 68
 ANAC085.2 --MERLWIVDGPWISRNVKNASLSSALQ--IKDCGAYINCFNCSYRIDNSNVLTPWPGLPKGVKFEPTD 65
 ANAC085.3 MKTLHRTWIVDGPWISRNVKNASLSSALQ--IKDCGAYINCFNCSYRIDNSNVLTPWPGLPKGVKFEPTD 68
 ANAC085.1 MKTLHRTWIVDGPWISRNVKNASLSSALQ--IKDCGAYINCFNCSYRIDNSNVLTPWPGLPKGVKFEPTD 68
 ANAC085.4 --MERLWIVDGPWISRNVKNASLSSALQ--IKDCGAYINCFNCSYRIDNSNVLTPWPGLPKGVKFEPTD 65
 ANAC044.1 --MARAWIVDGRGIAAKVKNASLSSALQ--IQDCGAHIKCFNCTYRIDNSNVLIWPWPGLPKGVKFEPTD 65
 ANAC044.2 --MARAWIVDGRGIAAKVKNASLSSALQ--IQDCGAHIKCFNCTYRIDNSNVLIWPWPGLPKGVKFEPTD 65

SOG1 PEIWHLLAKSGISGLSSHPIIDEFTPTVNDQDDGICVYTHPKNLPGVKSDGTVSHFFHKAIKAYSTGTRKR 138
 ANAC085.2 EEVIEHLEAKCGIDGLKPHLLIQDFICSVTQDVGINYTHPQNLPGVSKDGTSVFFFNKTAAHAYQNGQRKR 135
 ANAC085.3 EEVIEHLEAKCGIDGLKPHLLIQDFICSVTQDVGINYTHPQNLPGVSKDGTSVFFFNKTAAHAYQNGQRKR 138
 ANAC085.1 EEVIEHLEAKCGIDGLKPHLLIQDFICSVTQDVGINYTHPQNLPGVSKDGTSVFFFNKTAAHAYQNGQRKR 138
 ANAC085.4 EEVIEHLEAKCGIDGLKPHLLIQDFICSVTQDVGINYTHPQNLPGVSKDGTSVFFFNKTAAHAYQNGQRKR 135
 ANAC044.1 EDIEFLEAKCGIIGSEPHVLIIEEFIRPVTEDVGINYTHPQNLPGANKDGVSVFFFHKTVAAYGTGQRKR 135
 ANAC044.2 EDIEFLEAKCGIIGSEPHVLIIEEFIRPVTEDVGINYTHPQNLPGANKDGVSVFFFHKTVAAYGTGQRKR 135

SOG1 RKIHDDDFG--DVRWHKTGRITKPVMLDGVQRGCKKIMVLYGG----KAVKTNWVMMHQYHLGIEEDEKEG 201
 ANAC085.2 RRIPTSLKDDTVRWHKTGQTKPVMLNGIQKGCKKIMVLYKSARKGFKPEKSNWVLMHQYHLGTEEG- EIG 204
 ANAC085.3 RRIPTSLKDDTVRWHKTGQTKPVMLNGIQKGCKKIMVLYKSARKGFKPEKSNWVLMHQYHLGTEEG- EIG 207
 ANAC085.1 RRIPTSLKDDTVRWHKTGQTKPVMLNGIQKGCKKIMVLYKSARKGFKPEKSNWVLMHQYHLGTEEG- EIG 207
 ANAC085.4 RRIPTSLKDDTVRWHKTGQTKPVMLNGIQKGCKKIMVLYKSARKGFKPEKSNWVLMHQYHLGTEEG- EIG 204
 ANAC044.1 RKIPTLVDNDPVRWHKTGRITKPVMLSGVQRGCKKIMVLYKSARKGTKPEKSNWVLMHQYHLGTEGK- EIG 204
 ANAC044.2 RKIPTLVDNDPVRWHKTGRITKPVMLSGVQRGCKKIMVLYKSARKGTKPEKSNWVLMHQYHLGTEGK- EIG 204

SOG1 DYVVSKIIFYQQPQQLVVKRGDKAEQEVSEDIFAAVTPTADPVTPKLATPEPRNAVRIKSDSHIASDYVTP 271
 ANAC085.2 EYVVSKIITYQQPKQKEKTIDSESS-----GVRGGPSTPKTSTITQVRPVI SVDEDEIAFDDDSK 264
 ANAC085.3 EYVVSKIITYQQPKQKEKTIDSESS-----GVRGGPSTPKTSTITQVRPVI SVDEDEIAFDDDSK 267
 ANAC085.1 EYVVSKIITYQQPKQKEKTIDSESS-----GVRGGPSTPKTSTITQVRPVI SVDEDEIAFDDDSK 267
 ANAC085.4 EYVVSKIITYQQPKQKEKTIDSESS-----GVRGGPSTPKTSTITQVRPVI SVDEDEIAFDDDSK 264
 ANAC044.1 DYVVSKIITYQQQKLGENPDEGESESS-----GVRGGPTTPKTNTPTPPSLVDGVAGDEEAFDDLK- 263
 ANAC044.2 DYVVSKIITYQQQKLGENPDEGESESS-----GVRGGPTTPKTNTPTPPSLVDGVAGDEEAFDDLK- 263

SOG1 SDYVSAHEVSLAETSEVMCMEDEVQSIQPNHERPSSGPELEHGLENGAKEMLDDKEEQEKDRDNENQGE 341
 ANAC085.2 MVL-----DSYAEVSSFLC-----KYQ----- 281
 ANAC085.3 MVL-----DSYAEGLENIQ-----EASSGSTSDKI----- 292
 ANAC085.1 MVL-----DSYAEGLENIQ-----EASSGSTSDKI----- 292
 ANAC085.4 MVL-----DSYAEGLENIQ-----EASSGSTSDKI----- 289
 ANAC044.1 -MF-----DPFFFEELDSIP-----EAALGKMWSKK----- 287
 ANAC044.2 -MF-----DPFFFEELDSIP-----EAALGKMWSKK----- 287

SOG1 DPTWFDSGSQIILNSQLLVEALS L CDDLLGSQLDREENTNSGSLKDKQPCIADY AHLGPEDFKRDLEECQK 411
 ANAC085.2 -----AKVGGN--VS--VIEDNLM SK-KIEAS-----SIP-----NH--GNVDYG--SGNF 329
 ANAC085.3 -----AKVGGN--VS--VIEDNLM SK-KIEAS-----SIP-----NH--GNVDYG--SGNF 329
 ANAC085.4 -----AKVGGN--VS--VIEDNLM SK-KIEAS-----SIP-----NH--GNVDYG--SGNF 326
 ANAC044.1 -----ARMDEEFVN--LSEDNLICDESM EASLWENQ--VLP-----NPSLGTV--GD--FDGF 334
 ANAC044.2 -----ARMDEEFVN--LSEDNLICDESM EASLWENQ--VLP-----NPSLGTV--GD--FDGF 334

SOG1 IMLDPSNIELDTPPEFRLSQEFGSQDSFLAWGTGKTD 449
 ANAC085.2 ----- 281
 ANAC085.3 SVSDLENAELGTL PDLISF ASE-----DSL MNWLGWF-- 361
 ANAC085.1 SVSDLENAELGTL PDLISV RT----- 350
 ANAC085.4 SVSDLENAELGTL PDLISV RT----- 347
 ANAC044.1 SISDLENADLGT PDLITL A SQE--S--LLNWIGWL-- 366
 ANAC044.2 SISDLENADLGT PDLITVRSCL--KKT LFTFGKFNGT 370

図 26. ANAC044 および ANAC085 は SOG1 と相同性の高い NAC 型転写因子である

(A) SOG1 および 2 種の ANAC044、4 種の ANAC085 のアミノ酸構造の模式図。四角は左端を N 末端側、右端を C 末端側としたときのアミノ酸配列の一次構造を示し、N-terminally extended (NTE) ドメイン、NAC ドメイン、そして Transcriptinal regulatory (TR) ドメインに分けられる。NAC ドメインは A、B、C、D、E の 5 つのサブドメインから成る。各ドメインの後の数字は推定されるアミノ酸数を示す。

(B) SOG1、および 2 種の ANAC044 バリエント、4 種の ANAC085 バリエントのアミノ酸配列の比較。左端を N 末端側、右端を C 末端側としたときのアライメント解析による結果を示す。4 因子以上が同一残基 (identical residues) または類似アミノ酸 (similar residues) の場合、それぞれ黒色および灰色で色分けした。マゼンダ色の太線は推定される NAC ドメイン内の 5 つのサブドメイン (A、B、C、D、E) を表す。また、水色の四角は ATM および ATR のリン酸化モチーフである SQ を示す。

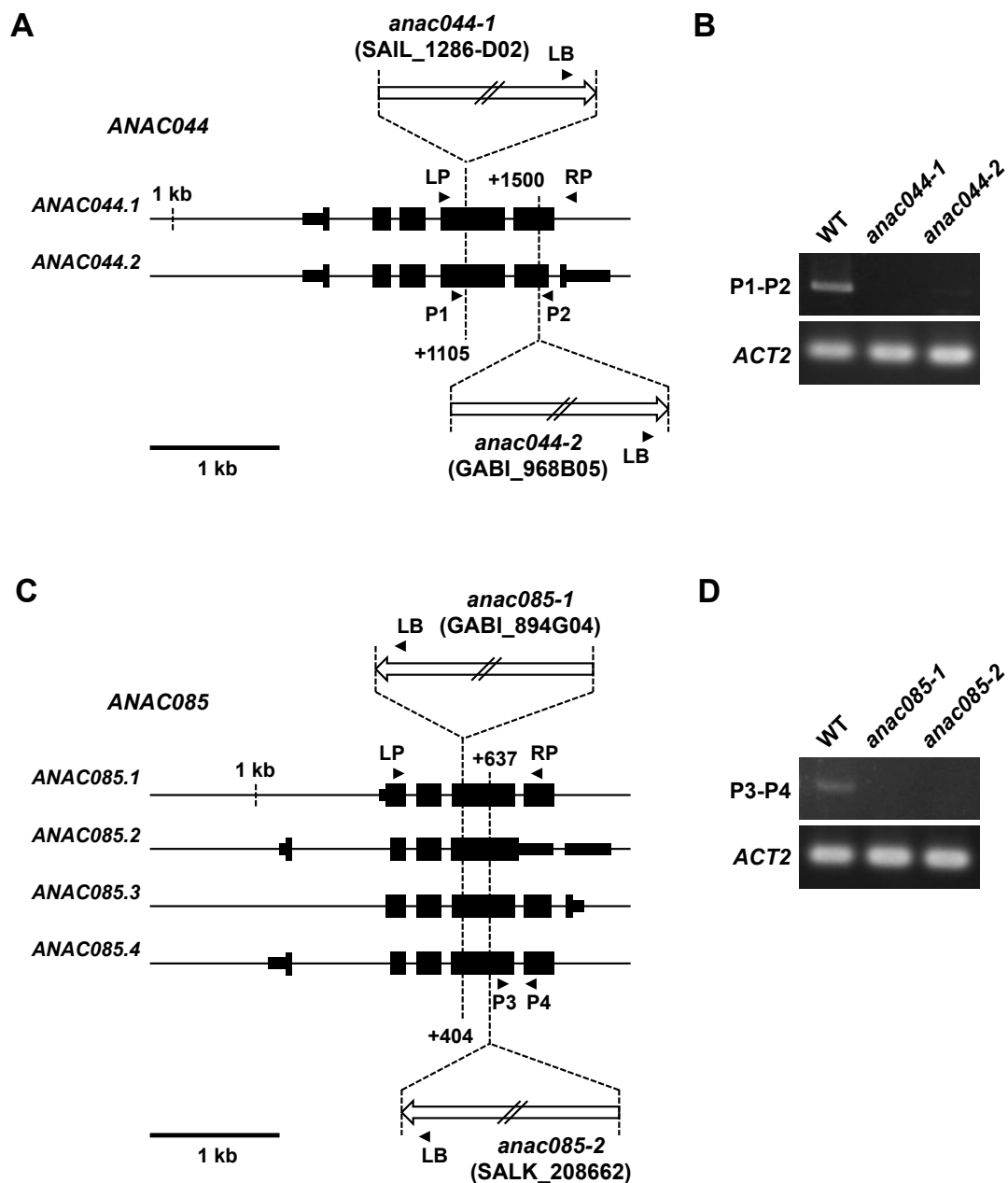


図 27. *ANAC044* および *ANAC085* 機能欠損変異体の単離

(A, C) *anac044-1* (SAIL_1286_D02) および *anac044-2* (GABI_968B05) の *ANAC044* の遺伝子座 (A) と、*anac085-1* (GABI_894G04) および *anac085-2* (SALK_208662) の *ANAC085* 遺伝子座 (C) を示す。黒色の四角はエクソンを表す。白色の矢印は T-DNA を表し、数字 (+1105、+1500、+404、+637) はそれぞれの *ANAC044.1* および *ANAC085.1* の翻訳開始点 ATG からの距離 (bp) を示す。黒の矢印は、ジェノタイピング (LP, RP, LB) および RT-PCR (P1-P4) で使用したプライマーの結合部位を示す。

(B, D) 発芽後 5 日目の野生型植物 (WT)、*anac044-1*、*anac044-2*、*anac085-1*、*anac085-2* における *ANAC044* および *ANAC085* 遺伝子の発現量を半定量 RT-PCR により比較した。*ACT2* の発現量はリファレンス遺伝子として用いた。

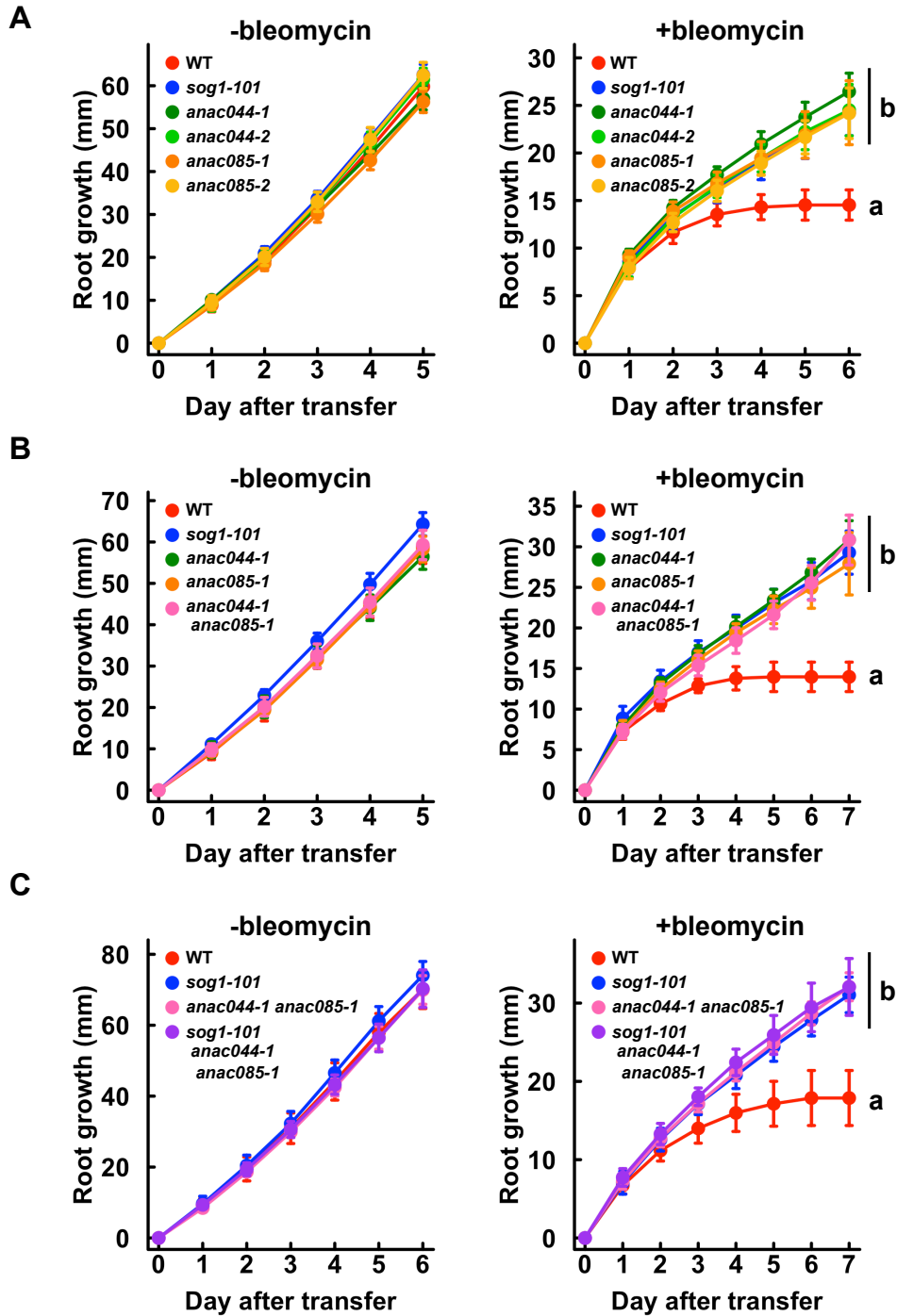


図 28. ANAC044 および ANAC085 は SOG1 の下流で DNA 損傷応答を正に制御する

野生型植物 (WT)、*anac044* 変異体、*anac085* 変異体の根の伸長。発芽後 5 日目の植物を、0.4 $\mu\text{g/ml}$ ブレオマイシンを含む (+bleomycin) または含まない (-bleomycin) MS プレートに移し、その後の 6 日間または 7 日間の根の伸長を測定した。(A) WT、*sog1-101*、*anac044-1*、*anac044-2*、*anac085-1*、*anac085-2*、(B) WT、*sog1-101*、*anac044-1*、*anac085-1*、*anac044-1 anac085-1*、(C) WT、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1*、*sog1-101 anac044-1 anac085-1*、の根の長さ。平均値および標準偏差は 10 個体以上の結果を基に算出した。各植物体のアルファベットが異なる場合、根の伸長に統計上有意味な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

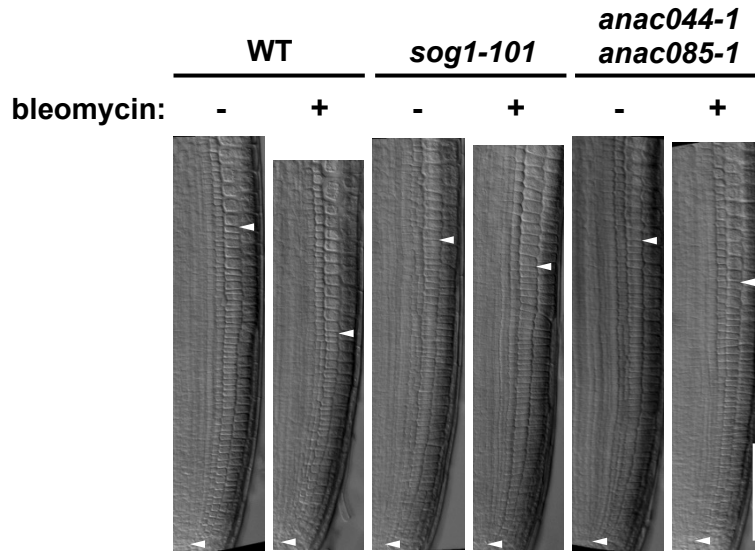
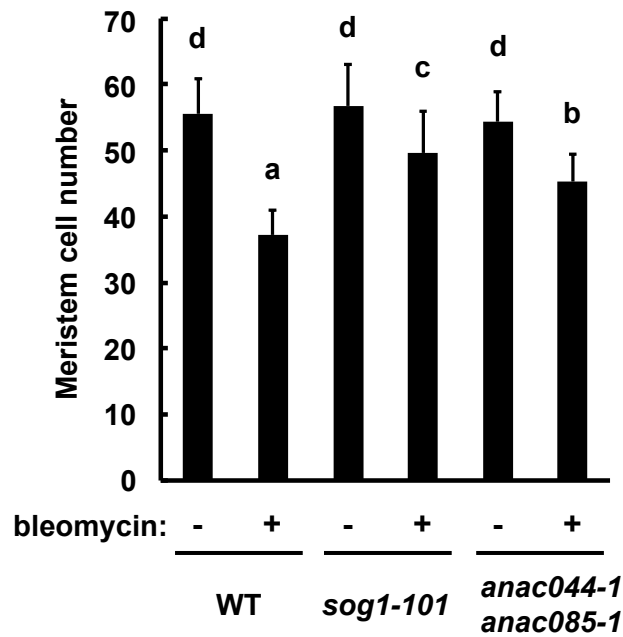
A**B**

図 29. ANAC044 および ANAC085 は DNA 損傷に応答した細胞周期の停止に関わる

(A) 発芽後 5 日目の野生型植物 (WT)、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* を、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ブレオマイシンを含む、もしくは含まない培地に移し、24 時間後に観察された根端分裂組織。皮層における分裂領域の境界を白色の三角で示した。スケールバーは 100 μm を示す。

(B) WT、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* の根端分裂組織の皮層細胞数。それぞれの値の平均値を棒グラフで示した ($n > 30$)。各値の上のアルファベットが異なる場合、PM 領域における細胞数に統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

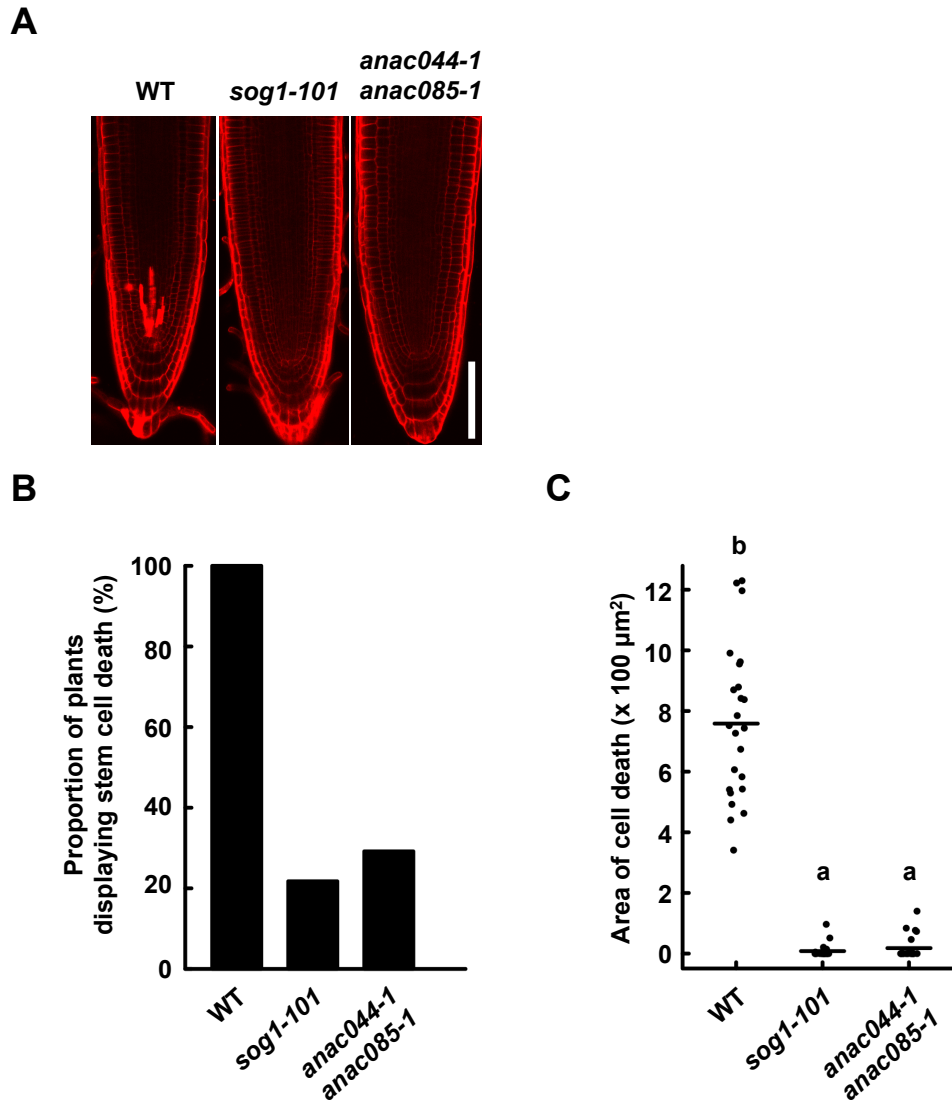


図 30. ANAC044 および ANAC085 は幹細胞の細胞死の誘導に関わる

(A) 発芽後 5 日目の野生型植物 (WT)、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* を 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ブレオマイシンを含む培地に移し、24 時間後に PI で染色した根端分裂組織。PI が細胞内まで染色された細胞は、死んだ細胞を示す。スケールバーは 100 μm を示す。

(B、C) 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ブレオマイシンを 24 時間処理した時に、野生型植物 (WT)、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* の根端の幹細胞において細胞死が認められた植物個体の割合 ($n = 24$) (B) と、細胞死を起こしていない個体も含め、細胞死を起こしている細胞の面積の平均値 ($n = 24$) (C)。各プロットの上のアルファベットが異なる場合、細胞死の面積に統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

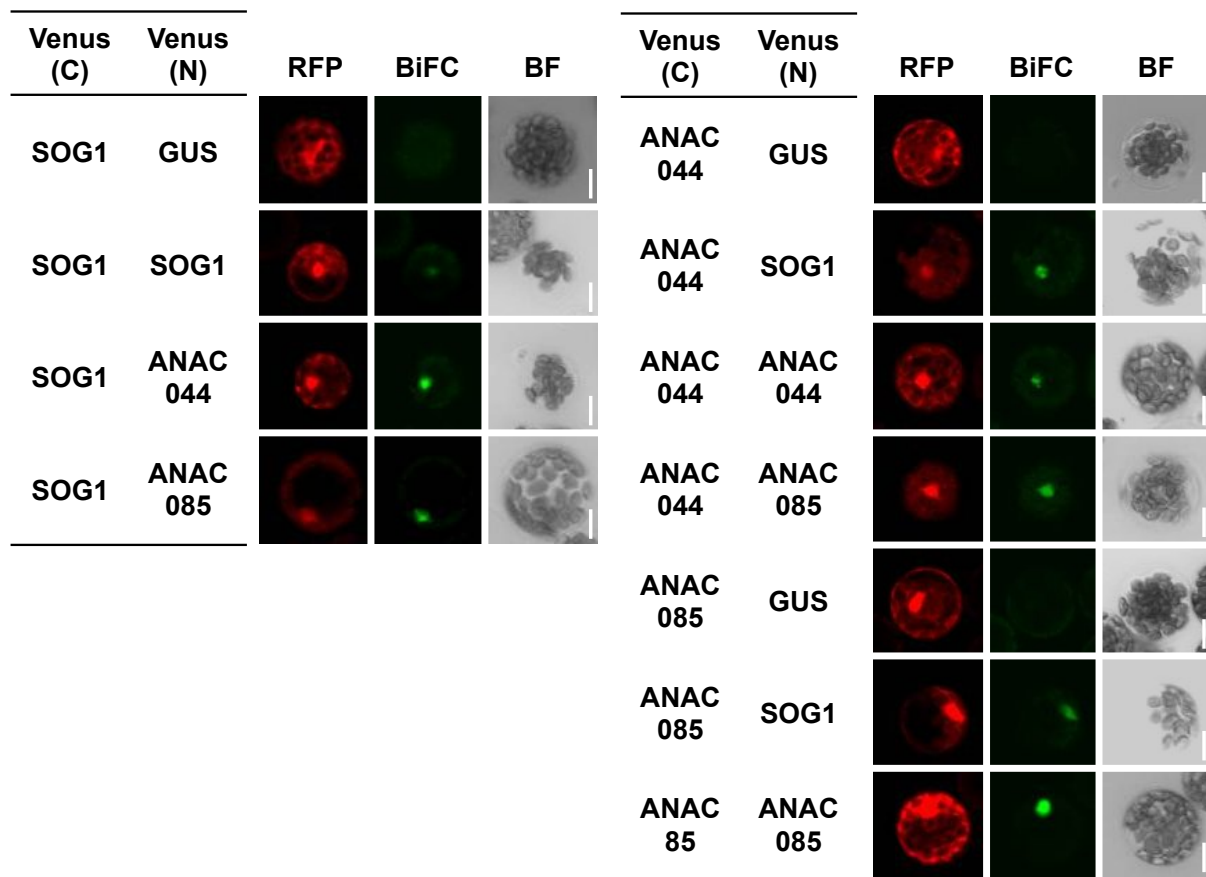
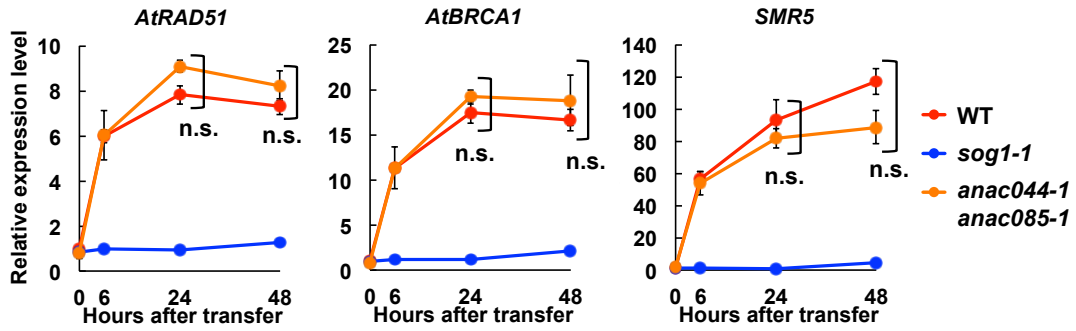


図 31. BiFC アッセイによる ANAC044.1 / ANAC085.1 と SOG1 の相互作用解析

BiFC アッセイによる SOG1、ANAC044.1、ANAC085.1 のタンパク質間相互作用。野生型植物の本葉から単離したプロトプラストに、蛍光タンパク質 Venus の N 末端、または C 末端を *SOG1*、*ANAC044.1*、*ANAC085.1*、*GUS* (ネガティブコントロール) にそれぞれ融合させたコンストラクトを一過的に導入し、20 時間後に BiFC の観察を行った。導入のコントロールとして、*35S:TagRFP* を発現させ、RFP 陽性細胞の中から、BiFC シグナルを観察した。Venus (C) および (N) はそれぞれ Venus タンパク質の C 末端側および N 末端側断片を示す。RFP は導入コントロールとして用いた RFP タンパク質から得られるシグナル、BiFC はタンパク質間相互作用により再構成された Venus タンパク質から得られるシグナル、BF は明視野 (bright field) を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

A



B

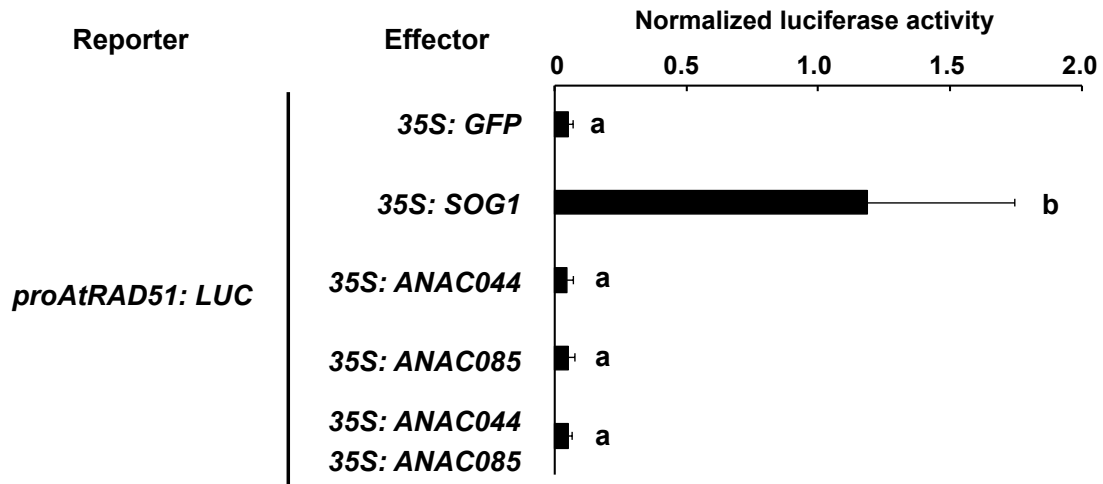


図 32. *ANAC044* および *ANAC085* は *SOG1* 標的遺伝子の発現制御に関与しない

(A) 野生型植物 (WT) および *sog1-1*、*anac044-1 anac085-1* での *SOG1* 標的遺伝子の経時的な発現変化。発芽後 5 日目の WT、*sog1-1*、*anac044-1 anac085-1* を、15 μ M ゼオシンを含む培地に移した後、6 時間、24 時間、48 時間後に根端を回収し、*SOG1* 標的遺伝子である *AtRAD51*、*AtBRCA1*、*SMR5* 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR 法により確認した。発現量は *ACT2* の発現量で標準化し、ゼオシン未処理を 1 とした時の相対値で表した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行って得られた値を基に算出した。WT と *anac044-1 anac085-1* 間の有意差検定は Student's t-test により行われた。

(B) プロトプラストを用いた一過性発現系による *SOG1*、*ANAC044.1*、*ANAC085.1* の *AtRAD51* プロモーターに対する転写活性。*sog1-101* の本葉から単離したプロトプラストに、レポーターコンストラクト (*AtRAD51::fLUC*)、およびエフェクターコンストラクト (*35S::SOG1*、*35S::ANAC044.1*、*35S::ANAC085.1*、*35S::GFP* (ネガティブコントロール))、リファレンスコンストラクト (*35S::rLUC*) を導入し、15 時間後に LUC 活性を測定した。レポーターコンストラクトによる値 (fLUC) はリファレンスコンストラクトによる値 (rLUC) で標準化した。平均値および標準偏差は独立して 3 回行った値を基に算出した。各サンプル上のアルファベットが異なる場合には統計上有意な差があることを示す ($p < 0.05$ 、one-way ANOVA、Tukey's HSD test)。

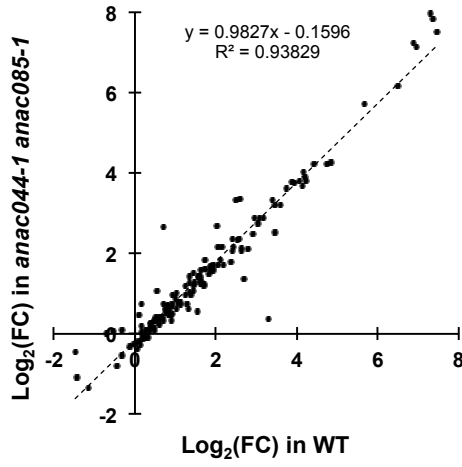
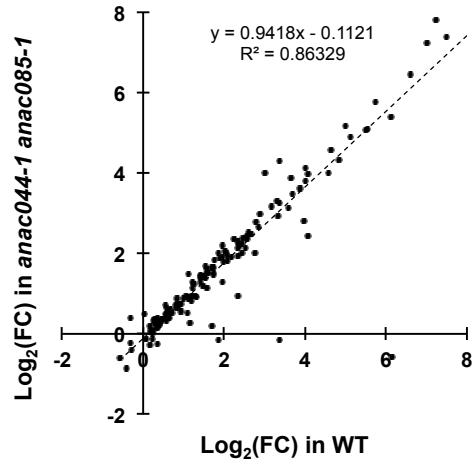
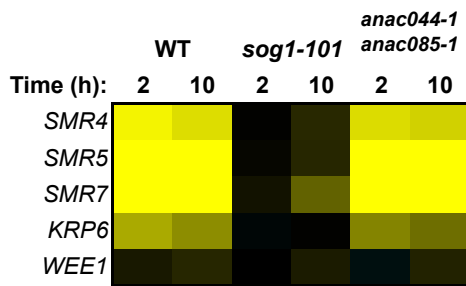
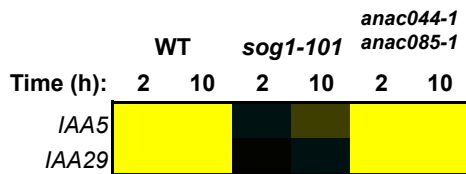
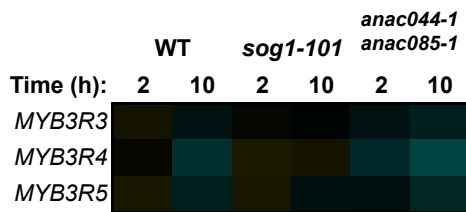
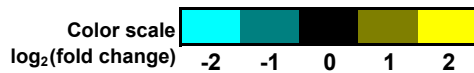
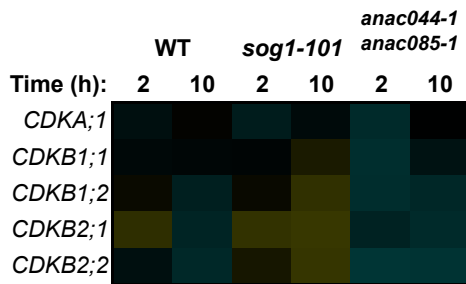
A**(1) 2 hr after bleomycin treatment****(2) 10 hr after bleomycin treatment****B****D****C****E****F**

図 33. *ANAC044* および *ANAC085* は *SOG1* の標的遺伝子および細胞周期遺伝子の発現制御に関与しない

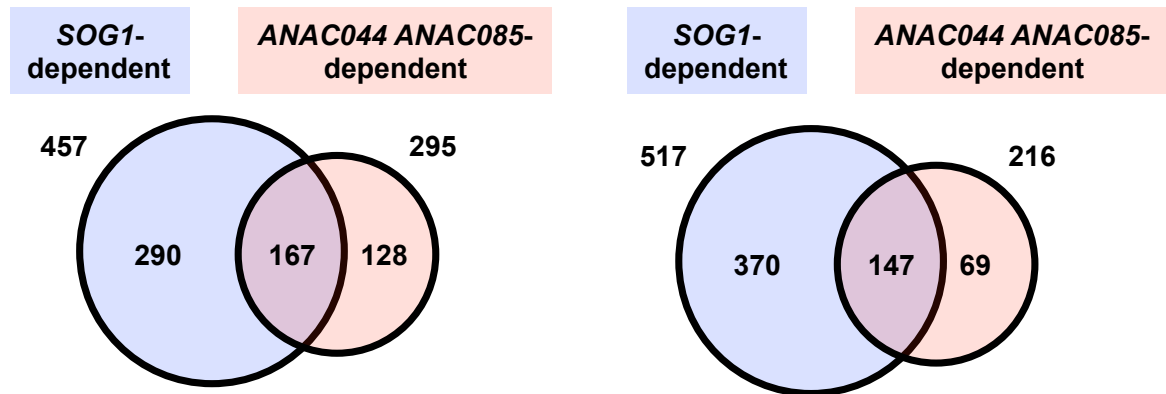
(A) 野生型植物 (WT) および *anac044-1 anac085-1* での、ブレオマイシン処理後の 146 個の *SOG1* 標的候補遺伝子の発現変動の比較。ブレオマイシン処理から 2 時間後、および 10 時間後のマイクロアレイ解析の結果を基に、横軸に WT における、縦軸に *anac044-1 anac085-1* における *SOG1* 標的遺伝子の発現変化 (Fold change: FC) を対数 (\log_2) でプロットした。また、ブレオマイシン処理から 2 時間および 10 時間後のプロットからそれぞれ回帰直線および相関係数 R^2 を求めた。

(B-F) 発芽後 5 日目の WT、*sog1-101*、*anac044-1 anac085-1* における 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ブレオマイシン処理 2 時間後および 10 時間後の DNA 損傷応答に関わる CDK 阻害因子 (B)、*AUX/IAA* (C)、サイクリン (D)、*MYB3R* 転写因子群 (E)、*CDK* (F) 遺伝子の発現変化をヒートマップで示した。ヒートマップの色はブレオマイシン処理前に対する相対的な発現量 (FC) を対数 (\log_2) で示しており、黄色は発現上昇、水色は発現低下を示す。

A

(1) 2 hr after bleomycin treatment

(2) 10 hr after bleomycin treatment



B

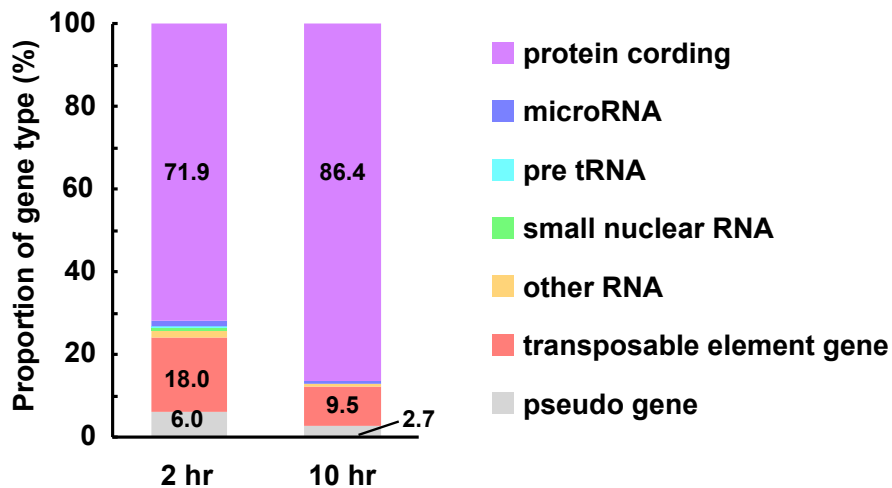


図 34. ANAC044 および ANAC085 は SOG1 下流で制御される遺伝子の約 3 割の遺伝子の発現に関わる

(A)ベン図は、ブレオマイシン処理から 2 時間後、および 10 時間後に SOG1 または ANAC044/ANAC085 依存的に発現が変動する遺伝子数を示す。未処理の植物と比べて、発現量が 2 倍以上増加もしくは 1/2 以下に低下した遺伝子 ($\log_2(\text{FC}) \geq |1|$) を発現変動遺伝子として単離した。

(B) SOG1 および ANAC044/ANAC085 の両方によって制御される遺伝子の分類。(A) で同定した 167 遺伝子 (2 時間後)、および 147 遺伝子 (10 時間後) に対して分析した結果を示した。グラフ上の数字はパーセンテージを示す。

2-4. 考察

第2章では、*ANAC044* および *ANAC085* が *SOG1* の直接の標的であることを確認した上で、これらの DNA 損傷応答における機能的役割と *SOG1* との関係性について解析を行った。そして、根の伸長および根端分裂組織の表現型を指標した遺伝学的解析および網羅的遺伝子発現解析により、*ANAC044* および *ANAC085* は *SOG1* の下流で、遺伝子発現を制御することにより DNA 損傷応答を正に制御していることを明らかにした。

ANAC044 および ANAC085 は G2 期での細胞周期の停止に関わる

G2 期からの M 期への進行には、M 期 CDK の活性化が必要である。シロイヌナズナでは、M 期 CDK が活性化すると、活性化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Act-MYB) である MYB3R4 がリン酸化されて活性化型となる (Haga *et al.*, 2007)。活性化した MYB3R4 は、G2/M 期特異的な遺伝子の発現を誘導することで、細胞周期が G2 期から M 期へ進行する (図 35)。一方で、DNA 二本鎖切断が起きた場合には、M 期 CDK の活性が低下することで、細胞周期が G2 期で停止する (Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。DNA 損傷が起きると、始めに、ATM または ATR によりリン酸化され活性化した *SOG1* が、CDK 阻害因子 (*SMR4*, *SMR5*, *SMR7*, *KRP6*, *WEE1*) を発現誘導することで CDK 活性が低下する (図 35 [1]) (Yi *et al.*, 2014; 本論文第 1 章)。さらに、*SOG1* 依存的に MYB3R4 遺伝子の発現が低下することで、G2/M 期遺伝子の発現が抑制される (図 35 [2]) (Adachi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017)。また、M 期 CDK である CDKB2 タンパク質が、*SOG1* 下流でプロテアソーム依存的に分解されることも報告されている (図 35 [3]) (Adachi *et al.*, 2011)。しかし、このような応答初期に見られる CDK 活性の低下だけでは G2 期停止には不十分であり、後に続く抑制化型 R1R2R3 MYB 転写因子 (Rep-MYB) である MYB3R3 および MYB3R5 タンパク質の働きが必須である。Rep-MYB は、DNA 損傷を受けていない条件では CDK に直接リン酸化されることによりタンパク質分解を受けているが、上述の様に DNA 損傷により CDK 活性が低下し始めると、Rep-MYB はリン酸化がされなくなることで安定化し、G2/M 期特異的な遺伝子の発現を抑制する (図 35 [4]) (Chen *et al.*, 2017)。

本研究では、DNA 二本鎖切断に応答した細胞周期の停止に、新たに *ANAC044* および *ANAC085* が関わるということが明らかとなった。興味深いことに、DNA 二本鎖切断に対する *anac044 anac085* 変異体の表現型と、*myb3r3* または *myb3r5* 変異体の表現型には類似点が多く存在する。例えば、根の伸長を指標とした場合には、それぞれの変異体は DNA 二本鎖切断に対して、*sog1* 変異体と同程度の低感受性を示す。また、*SOG1*

の標的である CDK 阻害因子 (*SMR5*, *SMR7* 等) の遺伝子発現が、*anac044 anac085* 変異体や *myb3r3* 変異体においては、野生型植物と同様に誘導されている。さらに、*MYB3R4* 遺伝子や M 期サイクリン遺伝子の発現もそれぞれの変異体で DNA 損傷にตอบสนองして低下していた (Chen *et al.*, 2017)。これらの結果から、ANAC044 および ANAC085 は Rep-MYB と同じ経路で G2 期停止に関わる新規の細胞周期制御因子である可能性が考えられる。上で述べた通り、Rep-MYB タンパク質は、通常条件ではタンパク質分解を受けている一方で、DNA 損傷下では安定化することで蓄積することから、ANAC044 および ANAC085 が、Rep-MYB のタンパク質の安定化に関与している可能性が考えられる。マイクロアレイ解析の結果から、ANAC044 および ANAC085 は、5 個の F-box タンパク質をコードする遺伝子の発現を減少させることを明らかにした。そのことから、ANAC044 および ANAC085 は、F-box 遺伝子の転写を制御することで、Rep-MYB タンパク質の安定化に寄与しているのかもしれない (図 35 [5])。また、Rep-MYB は、RETINOBLASTOMA RELATED (RBR) や E2FC、DP などのタンパク質と DREAM 複合体を形成することで機能していることが報告されている (Kobayashi *et al.*, 2015)。そのことから、ANAC044 と ANAC085 は、DREAM 複合体に関わることで、G2/M 期特異的遺伝子の発現抑制に関与しているのかもしれない (図 35 [6])。今後は、*anac044 anac085* 変異体における Rep-MYB タンパク質の安定性や、Rep-MYB が制御する G2/M 期特異的遺伝子の発現変化を調べることで、ANAC044 および ANAC085 がどのように Rep-MYB を介した G2 期停止機構に関与しているのかが明らかになると考えられる。

ANAC044 および ANAC085 による幹細胞死の誘導機構

植物は DNA 損傷を受けると幹細胞特異的に細胞死を引き起こす (Fulcher and Sablowski, 2009)。幹細胞は、様々な器官を作り出す源であることから、染色体 DNA に重篤な損傷を受けた場合、娘細胞に異常な遺伝情報が伝わるのを防ぐために積極的に細胞死を起こすと考えられる。現在までに、幹細胞の細胞死の誘導には、ATM、ATR、SOG1 が関わるということが報告されている (Furukawa *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013)。当研究室では、SOG1 の下流で、オーキシシグナルの抑制に関わる AUX/IAA ファミリーに属する *IAA5* および *IAA29* が幹細胞周辺で発現誘導されることで、オーキシシグナルを抑制し、幹細胞特異的な細胞死を誘導していることが示唆されている。本研究では、ANAC044 および ANAC085 も細胞死の誘導に関与することを見出したが、*anac044 anac085* 変異体では、DNA 損傷後の *IAA5* および *IAA29* 遺伝子の発現誘導が起きていたことから、SOG1-IAAs 経路は ANAC044 および ANAC085 と異なる経路で細胞死を誘導していることが考えられる (図 36)。一方、Rep-MYBs の変異体で

ある *myb3r3* および *myb3r5* も、DNA 二本鎖切断によって誘導される幹細胞の細胞死が抑制されることから、G2 期での細胞周期の停止が、細胞死の誘導に必要であることが示唆されている (Chen *et al.*, 2017)。そのことから、ANAC044 および ANAC085 は Rep-MYB を介して細胞周期の進行を抑制することにより、幹細胞の細胞死の誘導に関与しているのかもしれない (図 36)。また、幹細胞周辺で発現誘導される *IAA5* および *IAA29* とは異なり、ANAC044 や Rep-MYB タンパク質は根端分裂組織全体で発現していることから、細胞死を幹細胞特異的に誘導する空間的な制御は主に、SOG1-AUX/IAA 経路が担っていることが推察される。以上のことから、AUX/IAA が幹細胞周辺でオーキシシグナルを低下させる経路と、ANAC044 および ANAC085 が細胞周期を G2 期で停止させる経路が両方働くことにより、幹細胞特異的な細胞死の誘導を引き起こしていることが考えられる。

ANAC044 および ANAC085 は DNA 修復遺伝子の発現制御には関与しない

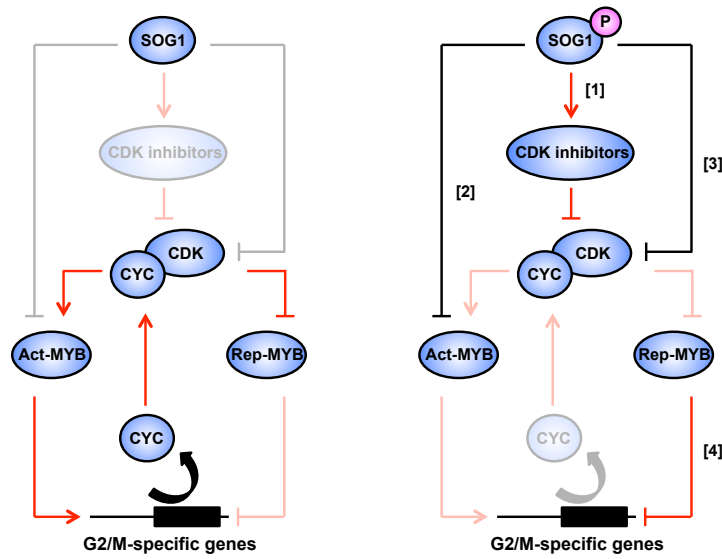
第 1 章で述べた通り、損傷 DNA を感知した植物細胞は、SOG1 を介して相同組換えに関わる遺伝子の発現を誘導し、損傷 DNA を修復することが考えられる。実際、DNA 損傷部位で観察される相同組換え因子 AtRAD54 タンパク質のフォーカス形成が SOG1 の下流で制御されることが最近の研究で報告された (Hirakawa *et al.*, 2017)。一方、ANAC044/085 制御遺伝子の中には、相同組換えに関わる遺伝子は一つも含まれていなかった。したがって、相同組換えによる DNA 修復は ANAC044 および ANAC085 を介さずに、SOG1 に直接制御されることが推察される。この仮説を検証するためには、*sog1* 変異体および *anac044 anac085* 変異体における DNA 損傷後の相同組換え活性を野生型植物と比較することが必要である。過去の研究によると、*GUS* レポーター遺伝子を改変したコンストラクトを植物体に導入することで、*in planta* で相同組換え活性を測定することが可能である (Puchta and Horn, 2012)。そのため、そのコンストラクトを *sog1* 変異体および *anac044 anac085* 変異体に導入すれば、ANAC044 および ANAC085 が相同組換えの誘導に必要であるかどうか明らかになる。

ANAC044 および ANAC085、SOG1 による複合体形成の機能的役割

NAC 型転写因子ファミリーの中には、相同性が高いもの同士で、ヘテロ複合体を形成するものがある。本研究では、ANAC044 および ANAC085 が最も相同性が高い関係にあり、互いに直接相互作用する関係性にある可能性が示唆された。また、ANAC044 または ANAC085 のどちらの機能が欠損したとしても、変異体は DNA 二本鎖切断に対して同程度の低感受性を示し、二重変異体の表現型もそれぞれの一重変異

体と同程度の低感受性を示した。したがって、ANAC044 および ANAC085 は、ヘテロ複合体を形成することによって機能を獲得し、DNA 損傷応答を実現している可能性が考えられる。さらに本研究では、ANAC044 および ANAC085 に最もアミノ酸配列の相同性が高い SOG1 も、ANAC044 および ANAC085 とヘテロ複合体を形成する可能性が示唆された。しかし、ANAC044 および ANAC085 は SOG1 標的遺伝子の発現制御に関与しないことが明らかになった。一方で、根の伸長における表現型の比較では、SOG1、ANAC044、ANAC085 のいずれの遺伝子が欠損しても、DNA 損傷に対して同程度の低感受性を示し、二重変異体および三重変異体でも変わらなかった。転写因子の中には、同じタンパク質ファミリー内の転写因子とヘテロ複合体を形成することで、DNA への結合特異性を変化させる場合がある。シロイヌナズナの例を挙げると、basic leucine zipper (bZIP) 転写因子である bZIP63 は、飢餓状態に応答して SUCROSE NON-FERMENTING RELATED KINASE 1 (SnRK1) キナーゼにリン酸化されることにより、ホモ二量体もしくは dZIP1、dZIP11 とヘテロ二量体を形成する。そして、これらは異なる複合体を形成することで、標的とする DNA 配列を変化させていることが示唆されている (Mair *et al.*, 2015)。また、オーキシシンシグナルに関わる転写因子である AUXIN RESPONSE FACTOR 1 (ARF1) および ARF5 はホモ二量体を形成して二つのオーキシシン応答エレメントを認識するが、それぞれが結合可能な二つのエレメント間の距離が異なっているため、両者は別々の遺伝子を標的とする。そして、異なる ARF 同士でヘテロ複合体を形成することで、DNA への結合特異性を変化させている可能性も示唆されている (Boer *et al.*, 2014)。このことから、SOG1、ANAC044、ANAC085 においても複合体形成の組み合わせによって、認識する DNA 配列が異なることが予想される。第 1 章で得られた知見も併せて考えると、SOG1 は DNA 損傷が起こると、ATM または ATR にリン酸化され、ホモ複合体を形成する。これにより、初期応答として SOG1 の標的遺伝子の発現が誘導される。その後、SOG1 の標的である ANAC044 および ANAC085 タンパク質が蓄積してくると、SOG1 が ANAC044 および ANAC085 とヘテロ複合体を形成する、もしくは、ANAC044 および ANAC085 がヘテロ複合体を形成することで、今回同定した ANAC044/085 制御遺伝子の発現を制御している可能性が考えられる。今後は、*sog1* 変異体で ANAC044 および ANAC085 を誘導的に発現させたときの表現型の観察や、相互作用ドメインに変異を導入し、タンパク質間相互作用を欠損させた時の DNA 損傷応答に与える影響について調べることで、複合体形成の機能的役割について明らかになることが期待される。

<これまでのG2期停止モデル(通常時)> <これまでのG2期停止モデル(DNA損傷時)>



<ANAC044およびANAC085のG2期停止における役割>

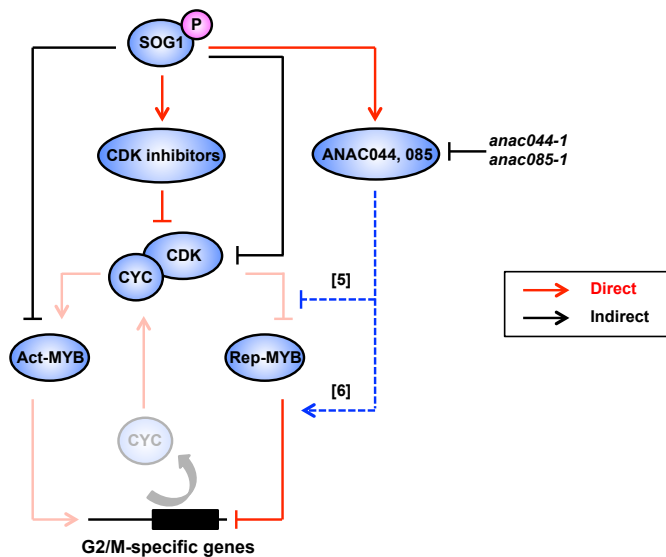


図 35. DNA 二本鎖切断によって細胞周期が G2 期で停止する分子機構のモデル

通常時では、M 期 CDK により、Act-MYB はリン酸化されることで活性化し、G2/M 期特異的の遺伝子の発現を誘導する。またこの時に発現される M 期サイクリンが M 期 CDK を活性化するため、M 期 CDK と Act-MYB の間にポジティブフィードバックが生じ、M 期への進行を促進する。DNA 損傷が起こると、ATM および ATR からの DNA 損傷シグナルを受けて SOG1 が活性化し、CDK 阻害因子 (SMRs、KRP6、WEE1) が M 期 CDK の活性を抑制する [1]。また SOG1 の下流で *Act-MYB* が転写抑制され、それに伴い、M 期サイクリンの発現も減少する [2]。さらに M 期 CDK の積極的なタンパク質分解も SOG1 の下流で制御される [3]。以上の応答により M 期 CDK の活性が一過的に減少すると、通常時には CDK のリン酸化により分解されていた Rep-MYB タンパク質が安定化し、G2/M 期特異的の遺伝子の発現を抑制することで、G2 期停止が可能となる [4]。ANAC044 および ANAC085 は Rep-MYB のタンパク質の安定化 [5] または転写機能を制御すること [6] により、G2 期停止に寄与していることが考えられる。

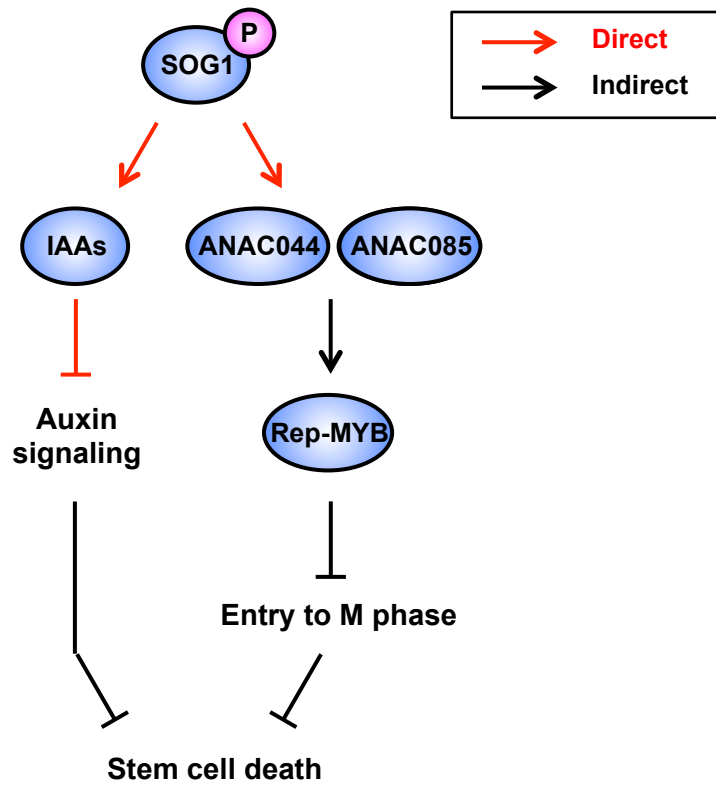


図 36. DNA 二本鎖切断によって幹細胞特異的に細胞死を誘導する分子機構のモデル

DNA 損傷が起こると、ATM および ATR からの DNA 損傷シグナルを受けて SOG1 が活性化し、IAA5 や ANAC044、ANAC085 を含めた標的遺伝子の発現を誘導する。IAA5 や SOG1 の下流で間接的に発現上昇する IAA29 は幹細胞周辺で発現が誘導され、幹細胞周辺におけるオーキシシンシグナルを低下させることで、幹細胞死を誘導する。一方、ANAC044 および ANAC085 はおそらく、Rep-MYBs を介して M 期への進行を阻害することで、細胞死の誘導を促進する。

結言

本論文では、植物の DNA 損傷応答におけるシグナル伝達系を明らかにするために、そのマスターレギュレーターである NAC 型転写因子 SOG1 に着目して、SOG1 の直接の標的遺伝子の探索と解析を行った。

第 1 章では、SOG1 の直接の標的候補遺伝子として 146 個の遺伝子を同定し、SOG1 の直下で制御される事象を分析した。その結果、SOG1 がチェックポイントや相同組換えによる DNA 修復、CDK の活性抑制に加えて、植物免疫応答や植物ホルモンシグナリング等を制御することが示唆された。そして、SOG1 と動物の p53 の標的遺伝子を比較した結果、両者は CDK の活性を多重的に抑制しており、DNA 損傷チェックポイントを制御する点で機能が類似することを見出した。一方で、SOG1 は相同組換えに関わる遺伝子を、p53 はミスマッチ修復や塩基除去修復に関わる遺伝子を標的としており、それぞれが異なる DNA 修復経路を制御することで植物または動物のゲノム DNA の恒常性維持に寄与していることを示した。また、SOG1 が ATM および ATR にリン酸化されることにより、標的プロモーターに結合することに加え、CTT(N)₇AAG 配列を認識することを見出した。さらに、SOG1 が制御するシグナル系が病原真菌に対する抵抗性の獲得に関与することも明らかにした。

第 2 章では、SOG1 の標的遺伝子の中で、SOG1 とアミノ酸配列の類似性が高い ANAC044 および ANAC085 に着目し、これらの機能的役割について解析を行った。その結果、ANAC044 および ANAC085 は SOG1 と同一の経路で細胞周期の停止、および、幹細胞に限定した細胞死の誘導を担う重要な因子であることを示した。また、網羅的遺伝子発現解析の結果、ANAC044 および ANAC085 は SOG1 の下流で制御される遺伝子群の内、約 3 割の遺伝子の発現を制御することにより、DNA 損傷応答を実現していることが考えられた。

以上を総括すると、本論文では、ATM および ATR のリン酸化により活性化した SOG1 は相同組換えによる DNA 修復や植物免疫応答等を直接誘導する一方で、ANAC044 および ANAC085 にシグナルを伝達することで、細胞周期の停止や幹細胞死の誘導を可能にすることを見出し、SOG1 を中心とした DNA 損傷応答制御系の新たな基本回路を明らかにしたと言える。

真核生物が生命活動をしていく上で、個々の細胞の遺伝情報が維持され、次世代に正しく伝達されることは極めて重要なプロセスである。そのため、自ら動いて生活環境を変えることのできない植物が、環境ストレスによって引き起こされる DNA 損傷にいかに対処しているかは興味深い。本研究で得られた知見は、植物が独自に獲得した DNA 損傷応答系の解明のみならず、劣悪な環境条件下で生育を可能にする植物の分子育種にも貢献することが期待される。

謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授 梅田正明先生の御指導の下、行われたものです。修士課程までウイルス学を専攻していたために植物生理学の知識が乏しかった私でしたが、梅田先生は博士課程の学生として快く受け入れ、本研究に取り組む機会を与えて下さりました。また、事ある毎に議論の機会を設け、研究の理解や考察が未熟な私に熱心に御指導して下さい、学会発表等の様々な形で学外の研究者とも議論する機会を設けて下さりました。心より感謝申し上げます。

同研究科教授 橋本隆先生、そして出村拓先生にはアドバイザー委員として、自身の研究に厳しくも温かい御助言や御指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

同研究科助教 高橋直紀先生は、実験手法からデータの解釈、発表の構成や論文の執筆まで、熱心に御指導して下さいました。幾度となく長時間にわたって議論し、忍耐強く叱咤激励して頂きましたこと、心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、同研究科前助教 奥島葉子先生や助教 高塚大知先生、愿山郁博士、岩川秀和博士、安喜史織博士、稲田のりこ博士、原千景氏をはじめ、研究室の方々には常日頃から貴重な御助言を頂き、また研究室の円滑な運営に御尽力頂きました。深く感謝申し上げます。

本研究におけるマイクロアレイ解析では理化学研究所の関原明博士と田中真帆氏に、ChIP-Seq 解析では奥島葉子先生、倉田哲也博士、坂本智昭博士に、AlphaScreen システムによる解析では岐阜大学応用生物科学部教授 山本義治先生、時澤睦朋博士に、病原菌感染実験に関しては同研究科准教授 西條雄介先生、助教 晝間敬先生に、多大なるご尽力を賜りました。深く感謝申し上げます。

本研究で使用した形質転換体 *ProSOG1::SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1::SOG1-MYC*、*sog1-1 ProSOG1::SOG1(5A)-MYC* は愿山郁博士に、*sog1-1* 変異体はカリフォルニア大学デービス校の Anne B. Britt 博士に、*sog1-7* 変異体はカリフォルニア大学リバーサイド校の Paul B. Larsen 博士に快く供与頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

平成27年度に公益財団法人 奈良先端科学技術大学院大学支援財団より研究費を助成して頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

博士課程への進学にあたり、温かく送り出して下さった創価大学工学研究科教授 高瀬明先生、そして高瀬研究室の皆様はこの場を借りて深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程で学ぶことを理解し、最後まで信じて温かく見守り応援して下さいました荻田文夫、久子夫妻、赤木(荻田)啓子氏、青春時代の苦楽を共にしてきた友人、そして、人生の師匠に心より感謝を申し上げるとともに、一生涯、報恩の人生を歩み抜くことをここに深くお誓い申し上げ、謝辞と致します。

平成 30 年 3 月 荻田伸夫

参考文献

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., and Umeda, M. (2011). Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 10004–10009.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell*, 9, 841–857.
- Aklilu, B.B., Soderquist, R.S., and Culligan, K.M. (2014). Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in *Arabidopsis* reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 42, 3104–3118.
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C.I., and Gallego, M.E. (2010). Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22, 3020–3033.
- Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C.J., Dexter, T., Irvani, M., Ashworth, A., and Silva, A. (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* 7, 219–224.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., and Li, W.W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 34, W369–W373.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281, 1674–1677.
- Barrett, T., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I.F., Soboleva, A., Tomashevsky, M., and Edgar, R. (2007). NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic Acids Res.* 35, D760–D765.

- Berriri, S., Gangappa, S.N., and Kumar, S.V. (2016). SWR1 Chromatin-Remodeling Complex Subunits and H2A. Z Have Non-overlapping Functions in Immunity and Gene Regulation in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, 9, 1051–1065.
- Bétermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process?. *PLoS Genet.* 10, e1004086.
- Beth Mudgett, M. (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 509–531.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*, 14, 359–370.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 4, 793–805.
- Boer, D.R., Freire-Rios, A., van den Berg, W.A., Saaki, T., Manfield, I.W., Kepinski, S., López-Vidrieo, I., Franco-Zorrilla, J.M., de Vries, S.C., Solano, R., Weijers, D., and Coll, M. (2014). Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell*, 156, 577–589.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 587–598.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 297–308.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282, 1497–1501.

- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281, 1677–1679.
- Chandran, D., Rickert, J., Huang, Y., Steinwand, M.A., Marr, S.K., and Wildermuth, M.C. (2014). Atypical E2F transcriptional repressor DEL1 acts at the intersection of plant growth and immunity by controlling the hormone salicylic acid. *Cell Host Microbe*, 15, 506–513.
- Chankova, S.G., Dimova, E., Dimitrova, M., and Bryant, P.E. (2007). Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat. Environ. Biophys.* 46, 409–416.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell*, 47, 497–510.
- Chen, P., and Umeda, M. (2015). DNA double-strand breaks induce the expression of flavin-containing monooxygenase and reduce root meristem size in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Cells*, 20, 636–646.
- Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M., and Umeda, M. (2017). *Arabidopsis* R1R2R3-Myb proteins are essential for cell cycle arrest in response to DNA damage. *Nat. Commun.* 8, 635.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 994–1002.
- Clair, S.S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., and Manfredi, J.J. (2004). DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the *cdc25C* promoter. *Mol. Cell*, 16, 725–736.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.

- Cools, T., Iantcheva, A., Weimer, A.K., Boens, S., Takahashi, N., Maes, S., Van den Daele, H., Van Isterdael, G., Schnittger, A., and De Veylder, L. (2011). The *Arabidopsis thaliana* checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *Plant Cell*, 23, 1435–1448.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
- Croteau, D.L., Popuri, V., Opresko, P.L., and Bohr, V.A. (2014). Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 519–552.
- Culligan, K., Tissier, A., and Britt, A. (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16, 1091–1104.
- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P., and Britt, A.B. (2006). ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48, 947–961.
- De Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics*, 20, 1453–1454.
- De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inzé, D., and De Veylder, L. (2007). *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell*, 19, 211–225.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inzé, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 1653–1668.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.
- Donjerkovic, D., and Scott, D.W. (2000). Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* 10, 1–16.

- Dou, D., and Zhou, J.M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*, 12, 484–495.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* 38, W64–W70.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817–825.
- Endo, H., Yamaguchi, M., Tamura, T., Nakano, Y., Nishikubo, N., Yoneda, A., Kato, K., Kubo, M., Kajita, S., Katayama, Y., Ohtani, M., and Demura, T. (2015). Multiple classes of transcription factors regulate the expression of *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7*, a master switch of xylem vessel differentiation. *Plant Cell Physiol.* 56, 242–254.
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Skriver, K., Larsen, S., and Leggio, L.L. (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep.* 5, 297–303.
- Feng, B., Liu, C., de Oliveira, M.V., Intorne, A.C., Li, B., Babilonia, K., de Souza Filho, G.A., Shan, L., and He, P. (2015). Protein poly (ADP-ribosyl) ation regulates *Arabidopsis* immune gene expression and defense responses. *PLoS Genet.* 11, e1004936.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* 20, 5400–5411.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E. (2005). *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*, 17, 2601–2613.
- Friesner, J.D., Liu, B., Culligan, K., and Britt, A.B. (2005). Ionizing radiation–dependent γ -H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia

- mutated and Rad3-related. *Mol. Biol. Cell*, 16, 2566–2576.
- Frohnmeier, H., and Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133, 1420–1428.
- Fu, Z.Q., and Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863.
- Fulcher, N., and Sablowski, R. (2009). Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 20984–20988.
- Furukawa, T., Curtis, M.J., Tominey, C.M., Duong, Y.H., Wilcox, B.W., Aggoune, D., Hays, J.B., and Britt, A.B. (2010). A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA repair*, 9, 940–948.
- Gao, Q.M., Venugopal, S., Navarre, D., and Kachroo, A. (2011). Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiol.* 155, 464–476.
- Garcia, V., Bruchet, H., Camescasse, D., Granier, F., Bouchez, D., and Tissier, A. (2003). *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell*, 15, 119–132.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Martienssen, R., and Colot, V. (2005). Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods*, 2, 213–218.
- Gene Ontology Consortium. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 32, D258–D261.
- Gladman, N.P., Marshall, R.S., Lee, K.H., and Vierstra, R.D. (2016). The proteasome stress regulon is controlled by a pair of NAC transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, 28, 1279–1296.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and

necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.

Guérinier, T., Millan, L., Crozet, P., Oury, C., Rey, F., Valot, B., Mathieu, C., Vidal, J., Hodges, M., Thomas, M., and Glab, N. (2013). Phosphorylation of p27^{KIP1} homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *Plant J.* 75, 515–525.

Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voss, U., Jürgens, G., and Ito, M. (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of *KNOLLE* transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 134, 1101–1110.

Hamdoun, S., Zhang, C., Gill, M., Kumar, N., Churchman, M., Larkin, J.C., Kwon, A., and Lu, H. (2016). Differential roles of two homologous cyclin-dependent kinase inhibitor genes in regulating cell cycle and innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 170, 515–527.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75, 805–816.

He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J., and Gallois, P. (2008). Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 774–783.

Heitzeberg, F., Chen, I., Hartung, F., Orel, N., Angelis, K. J., and Puchta, H. (2004). The Rad17 homologue of *Arabidopsis* is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *Plant J.* 38, 954–968.

Helden, J.V., Rios, A., and Collado-Vides, J. (2000). Discovering regulatory elements in non-coding sequences by analysis of spaced dyads. *Nucleic Acids Res.* 28, 1808–1818.

Henk, A.D., Warren, R.F., and Innes, R.W. (1999). A new *Ac*-like transposon of *Arabidopsis* is associated with a deletion of the *RPS5* disease resistance gene. *Genetics*, 151, 1581–1589.

- Heyman, J., Cools, T., Vandenbussche, F., Heyndrickx, K.S., Van Leene, J., Vercauteren, I., Vanderauwera, S., Vandepoele, K., De Jaeger, G., Van Der Straeten, D., and De Veylder, L. (2013). ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 342, 860–863.
- Hirakawa, T., Hasegawa, J., White, C.I., and Matsunaga, S. (2017). RAD54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells. *Plant J.* 90, 372–382.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 287, 1824–1827.
- Hiruma, K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Watanabe, S., Narusaka, Y., Shirasu, K., and Takano, Y. (2013). Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 9589–9594.
- Hu, Z., Cools, T., and De Veylder, L. (2016). Mechanisms used by plants to cope with DNA damage. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 439–462.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 249–264.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071–1078.
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., and Skriver, K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem. J.* 426, 183–196.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13583–13588.

- Johnson, R.E., Klassen, R., Prakash, L., and Prakash, S. (2015). A major role of DNA polymerase δ in replication of both the leading and lagging DNA strands. *Mol. Cell*, 59, 163–175.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.
- Kadota, K., Nakai, Y., and Shimizu, K. (2008). A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms Mol. Biol.* 3, 8.
- Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S. (2007). Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 19, 3961–3973.
- Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.S. (2009). The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J.* 28, 926–936.
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., and Attardi, L.D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev.* 27, 1016–1031.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50, 347–363.
- Kim, H.J., Nam, H.G., and Lim, P.O. (2016). Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 48–56.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 35, 225–231.

- Knoll, A., Fauser, F., and Puchta, H. (2014). DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Res.* 22, 191–201.
- Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., and Ito, M. (2015). Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34, 1992–2007.
- Komaki, S., and Sugimoto, K. (2012). Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol.* 53, 953–964.
- Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M.H., and Kav, N.N. (2011). Functional characterization of four APETALA2-family genes (*RAP2.6*, *RAP2.6L*, *DREB19* and *DREB26*) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75, 107–127.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., and Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19, 1855–1860.
- Lam, E., and Zhang, Y. (2012). Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends Plant Sci.* 17, 487–494.
- Lee, S., Seo, P.J., Lee, H.J., and Park, C.M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 70, 831–844.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 16, 319–331.
- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 127–134.
- Lu, X., Tintor, N., Mentzel, T., Kombrink, E., Boller, T., Robatzek, S., Robatzek, S.,

- Schulze-Lefert, P., and Saijo, Y. (2009). Uncoupling of sustained MAMP receptor signaling from early outputs in an Arabidopsis endoplasmic reticulum glucosidase II allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 22522–22527.
- Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21, 3448–3449.
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchler, T., Nägele, T., Vicente Carbajosa, J., Hanson, J., Baena-González, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Dröge-Laser, W., and Teige, M. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *eLife*, 4, e05828.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, 9, 153–166.
- Manova, V., and Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants—from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6, 885.
- Maréchal, A., and Zou L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012716.
- McDade, S.S., Patel, D., Moran, M., Campbell, J., Fenwick, K., Kozarewa, I., Orr, N.J., Lord, C.J., Ashworth, A.A., and McCance, D.J. (2014). Genome-wide characterization reveals complex interplay between TP53 and TP63 in response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 42, 6270–6285
- Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer*, 9, 714–723.
- Mishina, T.E., and Zeier, J. (2006). The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 141, 1666–1675.

- Missirian, V., Conklin, P.A., Culligan, K.M., Huefner, N.D., and Britt, A.B. (2014). High atomic weight, high-energy radiation (HZE) induces transcriptional responses shared with conventional stresses in addition to a core “DSB” response specific to clastogenic treatments. *Front. Plant Sci.* 5, 364.
- Mitsuda, N., Hisabori, T., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2004). VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 845–854.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 34–41.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., and Sekine, M. (2006). *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.* 580, 336–340.
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S.R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., and Giraud, E. (2013). A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 3450–3471.
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stüber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., Ver Loren van Themaat, E., Ma, L.J., and Vaillancourt, L.J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat.*

Genet. 44, 1060–1065.

Ohta, M., Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J.* 22, 29–38.

Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L. L., and Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 10, 79–87.

Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., and Kikuchi, S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10, 239–247.

Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J., and Green, J.R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27, 186–198.

Preuss, S.B., and Britt, A.B. (2003). A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics*, 164, 323–334.

Puchta, H., and Hohn, B. (2012). In planta somatic homologous recombination assay revisited: a successful and versatile, but delicate tool. *Plant Cell*, 24, 4324–4331.

Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S., and Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 17, 369–381.

R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H., and Knight, M.R. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 427, 858–861.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.

- Roitinger, E., Hofer, M., Köcher, T., Pichler, P., Novatchkova, M., Yang, J., Schlögelhofer, P., and Mechtler, K. (2015). Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics*, 14, 556-571.
- Rother, K., Kirschner, R., Sängler, K., Böhlig, L., Mössner, J., and Engeland, K. (2007). p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A. *Oncogene*, 26, 1949–1953.
- Sadasivam, S., and DeCaprio, J.A. (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat. Rev. Cancer*, 13, 585–595.
- Sakamoto, T., Inui, Y.T., Uruguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M., Umeda, M., Fukui, K., and Fujiwara, T. (2011). Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23, 3533–3546.
- Sakuraba, Y., Kim, Y.S., Han, S.H., Lee, B.D., and Paek, N.C. (2015). The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing *AREB1* transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *Plant Cell*, 27, 1771–1787.
- Saldanha, A.J. (2004). Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*, 20, 3246–3248.
- Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., and Avramova, Z. (2008). An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in *Arabidopsis* plants. *Nat. Protoc.* 3, 1018–1025.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.
- Sauret-Güeto, S., Schiessl, K., Bangham, A., Sablowski, R., and Coen, E. (2013). *JAGGED* controls *Arabidopsis* petal growth and shape by interacting with a divergent polarity field.

- Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-Iott, K.S., Sleckman, B.P., and Bassing, C.H. (2009). Formation of dynamic γ -H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol. Cell*, 34, 298–310.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9, 671–675.
- Schwertman, P., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2016). Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 379–394.
- Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different—DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* 128, 607–620.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14, 289–300.
- Shim, J.S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y.W., Choi, Y., Lee, J.S., Song, J.T., Kim, J.K., and Choi, Y.D. (2013). *AtMYB44* regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.* 73, 483–495.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18, 134–147.
- Sjogren, C.A., Bolaris, S.C., and Larsen, P.B. (2015). Aluminum-dependent terminal differentiation of the Arabidopsis root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *Plant Cell*, 27, 2501–2515.
- Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.L., and Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8:

- new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 27, 431–432.
- Somssich, M., Khan, G.A., and Persson, S. (2016). Cell wall heterogeneity in root development of *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7, 1242.
- Song, J., and Bent, A.F. (2014). Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog.* 10, e1004030.
- Song, J., Keppler, B.D., Wise, R.R., and Bent, A.F. (2015). PARP2 is the predominant poly (ADP-ribose) polymerase in *Arabidopsis* DNA damage and immune responses. *PLoS Genet.* 11, e1005200.
- Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol. Cell*, 12, 209–219.
- Sun, L., Yang, Z.T., Song, Z.T., Wang, M.J., Sun, L., Lu, S.J., and Liu, J.X. (2013). The plant-specific transcription factor gene *NAC103* is induced by bZIP60 through a new *cis*-regulatory element to modulate the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 76, 274–286.
- Sweeney, P.R., Britt, A.B., and Culligan, K.M. (2009). The *Arabidopsis* ATRIP ortholog is required for a programmed response to replication inhibitors. *Plant J.* 60, 518–526.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, 1803–1815.
- Thomas, C. (2012). Bundling actin filaments from membranes: some novel players. *Front. Plant Sci.* 3, 188.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13, 152–157.

- Tokizawa, M., Kobayashi, Y., Saito, T., Kobayashi, M., Iuchi, S., Nomoto, M., Tada, Y., Yamamoto, Y.Y., and Koyama, H. (2015). Sensitive to proton rhizotoxicity1, calmodulin binding transcription activator2, and other transcription factors are involved in aluminum-activated malate transporter1 expression. *Plant Physiol.* 167, 991–1003.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell*, 16, 2481–2498.
- Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., Reina-San-Martin, B., and Soutoglou, E. (2016). Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin. *Mol. Cell*, 63, 293–305.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P.C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J.D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J.C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., and De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* 6, 397.
- Vercammen, D., Van De Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inzé, D., and Van Breusegem, F. (2004). Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J. Biol. Chem.* 279, 45329–45336.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55, 5187–5190.
- Wang, H., Fowke, L.C., and Crosby, W.L. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*, 386, 451–452.

- Wang, S., Durrant, W.E., Song, J., Spivey, N.W., and Dong, X. (2010). *Arabidopsis* BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 22716–22721.
- Wang, S., Gu, Y., Zebell, S.G., Anderson, L.K., Wang, W., Mohan, R., and Dong, X. (2014). A noncanonical role for the CKI-RB-E2F cell-cycle signaling pathway in plant effector-triggered immunity. *Cell Host Microbe*, 16, 787–794.
- Watanabe, N., and Lam, E. (2005). Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J. Biol. Chem.* 28, 14691–14699.
- Weimer, A.K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M., and Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 5, 2068–2086.
- Welner, D.H., Lindemose, S., Grossmann, J.G., Møllegaard, N.E., Olsen, A.N., Helgstrand, C., Skriver, K., and Leggio, L.L. (2012). DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *Biochem J.* 444, 395–404.
- Wu, A., Allu, A.D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanol, M.I., Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., Fernie, A.R., Kaufmann, K., Xue, G.P., Mueller-Roeber, B., and Balazadeh, S. (2012). *JUNGBRUNNEN1*, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24, 482–506.
- Wu, F.H., Shen, S.C., Lee, L.Y., Lee, S.H., Chan, M.T., and Lin, C.S. (2009). Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*, 5, 16.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., and Chua, N.H. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14, 3024–3036.

- Xu, Z.Y., Kim, S.Y., Kim, D.H., Dong, T., Park, Y., Jin, J.B., Joo, S.H., Kim, S.K., Hong, J.C., Hwang, D., and Hwang, I. (2013). The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell*, 25, 4708–4724.
- Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H., and Demura, T. (2008). Vascular-related NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *Plant J.* 55, 652–664.
- Yan, S., Wang, W., Marqués, J., Mohan, R., Saleh, A., Durrant, W.E., Song, J., and Dong, X. (2013). Salicylic acid activates DNA damage responses to potentiate plant immunity. *Mol. Cell*, 52, 602–610.
- Yan, S., and Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 64–68.
- Yi, D., Alvim Kamei, C.L., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K.O., Larkin, J., Van den Daele, H., Conklin, P., Britt, A., Umeda, M., and De Veylder, L. (2014). The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell*, 26, 296–309.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.
- Yoshiyama, K., Conklin, P.A., Huefner, N.D., and Britt, A.B. (2009). Suppressor of gamma response 1 (*SOG1*) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12843–12848.
- Yoshiyama, K.O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., and Umeda, M. (2013). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 14, 817–822.
- Yoshiyama, K.O., Kimura, S., Maki, H., Britt, A.B., and Umeda, M. (2014). The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant*

Signal. Behav. 9, e28889.

Yoshiyama, K.O., Kaminoyama, K., Sakamoto, T., and Kimura, S. (2017). Increased phosphorylation of Ser-Gln sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 29, 3255–3268.

Zhang, C., Mallery, E.L., Schlueter, J., Huang, S., Fan, Y., Brankle, S., Staiger, C.J., and Szymanski, D.B. (2008). *Arabidopsis* SCARs function interchangeably to meet actin-related protein 2/3 activation thresholds during morphogenesis. *Plant Cell*, 20, 995–1011.

Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z.H. (2010). Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, 3, 1087–1103.